

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE REPOPULIERUNG
IN EINEM MAMMAKARZINOM DER MAUS
UNTER FRAKTIONIERTER BESTRAHLUNG

Maria-Luise Mayerhausen

Disbui. München

1988



Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. U. Hagen

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE REPOPULIERUNG
IN EINEM MAMMAKARZINOM DER MAUS
UNTER FRAKTIONIERTER BESTRAHLUNG

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maria-Luise Mayerhausen
Wallersdorf

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K.-R. Trott
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. Riethmüller
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. J. Kummermehr
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	14. 07. 1988

Für die Überlassung des Themas dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. K.-R. Trott.

Herrn Dr. J. Kummermehr danke ich recht herzlich für die intensive wissenschaftliche Betreuung und die Möglichkeit zu ausführlicher Diskussion bei Versuchsplanung, Durchführung und schriftlicher Abfassung dieser Dissertation.

Herrn Dr. R. Guttenberger danke ich für die Einweisung in die Auswertung der Autoradiographie, ebenso danke ich den Assistentinnen der Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft bei der praktischen Durchführung der Versuche.

Die Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung Neuherberg hat in großzügiger Weise durch die Bereitstellung der Tiere und des Versuchsmaterials die Ausführung der Experimente ermöglicht.

Gewidmet meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	4
2.1.	Tiermaterial	4
2.2.	Tumorsystem	4
2.3.	Transplantation des Tumors	4
2.4.	Quantifizierung des Tumorwachstums	6
2.5.	Bestrahlung der Tumoren und Dosimetrie	6
2.6.	Versuchsaufbau	8
2.7.	Dokumentation der Tumorstrahlenwirkung	13
3.	Ergebnisse	15
3.1.	Histologie	15
3.1.1.	Primärtumor	15
3.1.2.	Spätere Passagen (unbestrahlt)	16
3.1.3.	Histologische Veränderungen nach Bestrahlung	16
3.1.4.	Autoradiographisches Proliferationsmuster	18
3.2.	Größenwachstum der unbehandelten Tumoren	21
3.3.	Temporäre Ischämie und Tumorwachstum	23
3.4.	Ergebnisse des Vorversuchs (Fraktionierungseffekt)	26
3.4.1.	Wachstumsverhalten der bestrahlten Tumoren	26
3.4.2.	Quantifizierung der Wachstumsverzögerung	29
3.5.	Repopulierungsversuch	33
3.5.1.	Wachstumsverhalten nach Bestrahlung	33
3.5.2.	Quantifizierung der Wachstumsverzögerung	39



4.	Diskussion	45
4.1.	Biologische Grundlagen der fraktionierten Bestrahlung	45
4.2.	Wachstumsverzögerung in situ als Methode zur Darstellung der zellulären Strahlen- wirkung	50
4.3.	Repopulierungsleistung des Tumors AT 55	54
4.3.1.	Versuchsdesign	54
4.3.2.	Versuchsergebnisse	55
4.4.	Repopulierungsleistung in verschiedenen Tumoren von Nager und Mensch	60
4.4.1.	Zellproliferation und Wachstum unbehandel- ter Tumoren	60
4.4.2.	Ausmaß und Zeitverlauf der Repopulierung	62
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis	68

1. EINLEITUNG

Das Mammakarzinom ist der häufigste Organkrebs der Frau und stellt in Europa und Nordamerika auch die häufigste Krebstodesursache bei Frauen dar. Der Altersgipfel liegt im 5. und 6. Lebensjahrzehnt. Dabei zeigt die Morbidität ansteigenden Trend. Beim Mann ist der Brustdrüsenkrebs relativ selten, er macht etwa 2 % aller malignen Mammatumoren aus. Die Ätiologie ist weitgehend unbekannt. Als Risikofaktoren gelten familiäre Disposition, hormonelle Faktoren, Viren, prädisponierende Vorerkrankungen und falsche Ernährung.

Morphologisch ist das Mammakarzinom vielgestaltig. Nach dem Vorschlag der WHO (1981) werden die Mammakarzinome eingeteilt in a) intraduktale und lobuläre, nicht infiltrierende Karzinome, b) invasive duktile Karzinome (Sziirrus, Carcinoma solidum simplex, medulläres Karzinom), c) besondere Karzinomtypen (papilläre, kribriforme, verschleimende Karzinome, Morbus Paget, Plattenepithelkarzinome). Die Tumoren der Gruppe b machen 80-90 % aller Mammakarzinome aus (35).

Früher lag die Therapie des Mammakarzinoms fast ausschließlich in der Hand des Chirurgen. Die radikale Mastektomie nach Rotter-Halstedt, bzw. die erweiterte radikale Mastektomie als superradikaler Eingriff mit Ausräumung der retrosternalen Mammaria-Lymphknoten, der supraklavikulären Lymphdrüsengruppen und Brustwandresektion, war die Therapie der Wahl. Diese extrem invasiven Eingriffe bringen im Vergleich zu den reduzierteren chirurgischen Eingriffen, wie sie heute durchgeführt werden, keine Verbesserung der Überlebenszeit. Als Standardoperation gilt zur Zeit die modifizierte radikale Mastektomie nach Patey unter Belassung der Pektoralismuskulatur und mit Entfernung der axil-

lären Lymphknoten. Bei Tumoren im Stadium $T_1N_0M_0$ ist auch die Tylektomie bzw. Quadrantenresektion unter Mitnahme der axillären Lymphknoten indiziert.

Neben der operativen Therapie spielt die Strahlentherapie bei der Behandlung des Mammakarzinoms heute eine wichtige Rolle. Die Indikation für eine postoperative Bestrahlung wird nicht einheitlich gestellt. Sie ist abhängig von Tumorgröße, Lokalisation und Lymphknotenstatus. Eine Bestrahlung erfolgt bei eingeschränkter Radikalität der Operation, großen oder nicht sicher im Gesunden entfernten Lymphknoten, oder eventuell auch als Vorbestrahlung bei primär inoperablen Tumoren. Die Radiotherapie wird perkutan über Brustwandfelder als Megavoltstrahlung, also als hochenergetische Strahlung, mit Kobalt 60 oder Linearbeschleuniger durchgeführt. Eine weitere strahlentherapeutische Behandlungsmöglichkeit basiert auf der Implantation von radioaktivem Material in das Tumorgewebe. Diese interstitielle Therapie mit Iridiumdraht wird als Primärbehandlung von Frühstadien und zur Dosisüberhöhung (boost) bei lokal weit fortgeschrittenen Mammatumoren verwendet (13). Chemotherapie und endokrine Therapie kommen vor allem in Spätstadien und bei Metastasierung zur Anwendung.

Die Strahlentherapie stellt somit einen wichtigen Faktor in der Behandlung des Mammakarzinoms dar. Ziel der Radiotherapie ist die Inaktivierung von Metastasen in den regionären Lymphabflußgebieten und die Senkung der Lokalrezidivrate. Mögliche Frühkomplikationen sind Übelkeit, Erbrechen, Leuko- und Thrombopenie. Später stehen Strahlenfolgen von Seiten des Herzens, der Lunge, der Haut und der Lymphabflußwege (v. a. Lymphödem des Armes) im Vordergrund.

Um diese Nebenwirkungen bei Wahrung der Tumorheilungschance möglichst gering zu halten, stellt sich für den Strahlentherapeuten immer wieder die Frage nach dem optimalen Bestrahlungs- und Fraktionierungsmodus. Tierexperimentelle Untersuchungen bearbeiten dieses Problem zur Zeit intensiv. Dabei zeigt sich, daß chronische Strahlenfolgen durch die Reduzierung der Dosis pro Fraktion verringert werden können. Die klinische Umsetzung in Form der Hyperfraktionierung eröffnet somit einen aussichtsreichen Weg zur relativen Schonung spät reagierender Normalgewebe. Dieser Vorteil kann jedoch verlorengehen, wenn die Verteilung der Dosis auf eine wesentlich höhere Fraktionszahl mit einer Verlängerung der Gesamtbehandlungszeit erkaufte wird.

Erst in neueren klinischen Analysen (26, 43, 50) und biologisch begründeten Abschätzungen (41, 44) wird die quantitative Bedeutung der Repopulierung, d.h. der Tumorzellproliferation im Behandlungszeitraum und die damit verbundene mögliche Erhöhung der Strahlenresistenz deutlich: Die tatsächliche Datenbasis erlaubt jedoch noch keineswegs einen Überblick über so wichtige Einflußgrößen, wie die Abhängigkeit vom histologischen Tumortyp, vom Fraktionierungsrhythmus, oder auch über mögliche Schwankungen der Repopulierungsrate im Verlauf einer kurativen Bestrahlung.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Repopulierungsleistung eines Mammarkarzinoms der Maus unter quasi-klinischer Fraktionierung über zwei Behandlungswochen hinweg quantitativ zu untersuchen. Die experimentellen Ergebnisse des Tiermodells können zwar nicht ohne Einschränkung auf den Menschen übertragen werden, sollten aber doch Hinweise auf mögliche tumortypische Unterschiede geben.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiermaterial

Alle Versuche wurden an spezifiziert-pathogenfreien weiblichen Mäusen vom Stamm C3H, Linie Neuherberg, durchgeführt. Die Tiere wurden mit Standardfutter Altromin^(R) (Fa. Altrogge, Lage) und Wasser ernährt und in einem voll klimatisierten Tierstall bei 24°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12/12 h gehalten. Das Versuchsalter betrug 10 bis 12 Wochen, was einem durchschnittlichen Gewicht von 21 ± 1 g entsprach.

2.2. Tumorsystem

Der Tumor AT 55 wurde 15 Monate nach kurativer Bestrahlung eines transplantablen Fibrosarkoms, jedoch außerhalb des Bestrahlungsfeldes, als langsam wachsende Neubildung am Vorderbein einer C3H-Maus entdeckt. In dieser Lokalisation kommen auch spontane Karzinome der Milchleiste vor, jedoch muß zunächst davon ausgegangen werden, daß es sich hier um einen durch die nicht unerhebliche Streustrahlung verursachten strahleninduzierten Tumor handelt. Der Schnellschnitt zeigte ein feinknotiges Adenokarzinom. In allen folgenden Passagen wurde der Tumor stets auf C3H-Mäuse, also auf den isogenen Tierstamm übertragen.

2.3. Transplantation des Tumors

Für die verwendeten Spendertumoren galt als Hauptkriterium, daß ihre Wachstumsgeschwindigkeit einem durchschnittlichen Wert der jeweiligen Passage entsprach. Die Tumormasse des Spenders lag bei Transplantation zwischen

500 und 800 mg. Nach raschem Abtöten des Spendertieres durch zervikale Dislokation wurde der subkutan gelegene Tumorknoten entnommen und in 0,9%ige NaCl-Lösung gelegt. Mit Schere und Pinzette wurde umliegendes Gewebe abpräpariert. Der Tumor wurde mit einer Rasierklinge in Würfel von 1 mm Kantenlänge zerlegt und die so gewonnenen Partikel in frische NaCl-Lösung gebracht, um Zelldebris und noch vorhandene Blutreste zu entfernen.

Die Empfängertiere wurden in der Zwischenzeit folgendermaßen vorbereitet: Das Fell über der dorsolateralen rechten Thoraxregion wurde geschoren und das Tier mit etwa 0,15 ml 2%iger Evipanlösung^(R) (Na-Hexobarbital) intraperitoneal narkotisiert. Narkose mit vollständiger Muskelrelaxation trat daraufhin nach ca. 3 Minuten ein. Im geschorenen Areal wurde die Haut nach Desinfektion mit 70%igem Alkohol durch Scherenschlag eröffnet und mit Hilfe eines Trokars ein Tumorstück kaudal der Skapula eingeschoben und subkutan deponiert.

Dieser Transplantationssitus hat mehrere Vorteile:

- Der Tumor läßt sich im tangentialen Strahlengang ohne Einbeziehung von allzu viel Lungen- und Lebergewebe bestrahlen.
- Die Thoraxwand erleichtert als harte Unterlage die externe Größenmessung.
- Auf Grund der guten Verschieblichkeit im subkutanen Raum kann die Tumorbasis zur Schaffung anoxischer (ischämischer) Zustände mit einer Klemme leicht umfaßt werden.

Nach der Transplantation erhielt jede Maus eine eindeutige Ohrmarkierung, die für die spätere individuelle Protokollierung notwendig war.

Nach dieser Methode wurden insgesamt 430 Tiere transplan-

tiert. Die Angehrate lag bei 88 - 90%. Den Bestrahlungsversuchen wurden insgesamt 2/3 dieser Tiere zugeführt, weil Tumoren mit extremen Wachstumseigenschaften aus Gründen der Standardisierung ausgeschieden wurden.

2.4. Quantifizierung des Tumorwachstums

Die in den Bestrahlungsversuchen verwendeten Tumoren waren durchschnittlich 3 Wochen nach Implantation palpabel und gelangten nach weiteren 1 bis 2 Wochen in den meßbaren Bereich (≥ 20 mg). Da die Volumenverdopplungszeit des zu untersuchenden Systems bei etwa 8 bis 10 Tagen lag, wurde jeden 6. bis 7. Tag eine Messung durchgeführt, um eine ausreichend engmaschige Überwachung zu erreichen. Als einfaches Meßgerät diente eine Plexiglasplatte mit Bohrungen im Durchmesserbereich 3 bis 15 mm. Jeder Bohrung entsprach dabei ein in früheren Kalibrierungen ermitteltes Tumorgewicht. Dieses Verfahren liefert bei einigermaßen regelmäßig gewachsenen, annähernd kugeligen Tumoren ausreichend genaue Meßwerte. Die notwendige Reproduzierbarkeit der Messung, die im subjektiven Einpassen eines Tumors in ein Bohrloch besteht, kann erfahrungsgemäß rasch erreicht werden (23, 46).

2.5. Bestrahlung der Tumoren und Dosimetrie

Die Tumoren wurden mit einer Röntgenanlage Isovolt 420 der Firma Seifert, Ahrensburg, bestrahlt. Das Gerät arbeitete mit einer Röhrenspannung von 300 kV und einem maximalen Röhrenstrom von 12 mA, wobei im Fokus-Haut-Abstand von 21 cm eine Dosisleistung von ca. 5 Gy/min erreicht wurde. Zur Filterung dienten 0,5 mm Cu und 1 mm Al.

Unter der Röntgenröhre wurde ein Karussell zur Aufnahme

der Tiere zentriert. Es drehte sich einmal pro Minute um 360°. Eventuell auftretende Dosisunregelmäßigkeiten auf Grund des sog. Heel-Effektes, der durch die unterschiedliche Absorption der Bremsstrahlung in der schräg gestellten Anode zustande kommt, wurden dadurch ausgeglichen. Den Abschluß des Karussells nach oben bildete eine 6 mm dicke Bleiplatte mit Längsschlitzen, die das Bestrahlungsfeld für 5 Tumoren und eine Ionisationskammer definierte.

Für die Bestrahlung wurde jedes Tier durch i.p. Injektion von Evipan^(R) (2%ige Na-Hexobarbitallösung) narkotisiert. Nach Eintritt der Narkose konnten die Tumoren unter Verwendung von verschraubbaren Plastikzangen an ihrer Basis vorübergehend von der Blutzufuhr abgeklemmt und so in einen anoxischen Zustand überführt werden. Durch Schnellfixierung dieser Plastikklemmen auf einem Plastikeinschub für das oben beschriebene Karussell konnten jeweils 5 Tiere ohne Zeitverlust positioniert werden. In Verbindung mit der Abdeckung war damit eine sichere Bestrahlung der Tumoren im tangentialen Strahlengang möglich. Um in jedem Fall anoxische Bedingungen zu schaffen, wurde der Beginn der Ischämiezeit auf mindestens 5 Minuten vor Bestrahlung gelegt.

Die eingestrahlte Dosis wurde in jeder Sitzung mit einem Simplexdosimeter (Firma Phywe, Freiburg) registriert. Die Ionisationskammer des Systems befand sich hierbei in gleicher Position wie die zu bestrahlenden Tumoren im Strahlengang. Das Erreichen des vorgewählten Dosiswertes wurde durch ein akustisches Signal angezeigt, womit gleichzeitig ein automatisches Abschalten der Strahlenquelle verbunden war.

Im Anschluß an die Bestrahlung wurden die typischen Strahlenfolgen an der Haut beobachtet:

Etwa ein bis zwei Wochen post radiationem traten zunächst

Erytheme mit Ödemen und Haarausfall sowie trockene Schuppung auf. Anschließend setzte in Abhängigkeit von der Dosis eine feuchte Radiodermatitis ein, die in eine Reepithelialisierung mündete und nach 5 Wochen abgeheilt war. Als Reaktion auf höhere Dosen stellten sich im weiteren Verlauf Pigmentverlust (weiße Wiederbehaarung) und Hautatrophie ein, manchmal auch eine indurierende Fibrose.

Diese Hautveränderungen erschwerten bei einigen Tieren das Messen des Tumors im weiteren Verlauf des Experimentes. Die in einem sehr geringen Prozentsatz der Fälle, vorwiegend nach höheren Dosen, auftretenden Ulzerationen und Wachstumsveränderungen des Rezidivs hin zu flächenhafter Ausbreitung zwangen auf Grund der Meßerschwerernisse dazu, die entsprechenden Tiere aus dem Versuch herauszunehmen.

2.6. Versuchsaufbau

Folgende Versuchsgruppen wurden gebildet:

A: Unbestrahlte Kontrollgruppen zur Untersuchung des uneinflußten Tumorwachstums in fortlaufenden Passagen.

Passage 1	:	5 Tiere
Passage 2	:	5 Tiere
Passage 3	:	5 Tiere
Passage 4a	:	10 Tiere
Passage 4b	:	10 Tiere
Passage 5	:	8 Tiere
Passage 6	:	10 Tiere
Passage 7	:	9 Tiere
Passage 8	:	10 Tiere

B: Um den Abklemmeffekt auf den Tumor zu untersuchen, wurde eine unbestrahlte Kontrollgruppe von 8 Tieren gebildet, die dreimal einer Ischämiezeit von jeweils ca. 15 Minuten und zwar im Abstand von 4 Stunden unterzogen wurde. Diese Versuchstiere entstammten der Passage 5 und wurden mit unbehandelten Tumoren derselben Passage verglichen.

C: Vorversuch (Passage 3)

Zur Ermittlung des verwertbaren Dosisbereichs wurden Bestrahlungen mit Einzeldosen und 4 Fraktionen unter anoxischen Bedingungen durchgeführt, wobei das Intervall zwischen den einzelnen Fraktionen 4 Stunden betrug.

Anzahl der Tiere	Bestrahlungsdosis
5	10 Gy Einzeldosis
5	20 Gy Einzeldosis
5	30 Gy Einzeldosis
5	40 Gy Einzeldosis
5	50 Gy Einzeldosis
5	4 x 3,5 Gy
5	4 x 8 Gy
5	4 x 13 Gy
5	4 x 15 Gy
5	4 x 17 Gy

D: Untersuchung der Repopulierungsleistung unter quasi-klinischer, fraktionierter Bestrahlung (Passage 4b). Die Behandlung bestand in der spezifizierten fraktionierten Bestrahlung und einer anschließend gegebenen Testdosis (alle Dosen unter Hypoxie).

	Anzahl der Tiere	Fraktionierungs- schema	Testdosis
a)	5	6x7Gy/7d	0 Gy
	10		15 Gy
	10		22 Gy
	10		28 Gy
	10		33 Gy
b)	5	6x7Gy/30h	0 Gy
	10	(Mindestabstand 4h)	10 Gy
	10		18 Gy
	10		24 Gy
	10		29 Gy
c)	10	6x7Gy/7d plus	0 Gy
	10	6x7Gy/7d	10 Gy
	10		18 Gy
	10		25 Gy
d)	10	6x7Gy/7d plus	0 Gy
	10	6x7Gy/30h	9 Gy
	10		15 Gy
	10		20 Gy
e)	10	Keine fraktionierte	30 Gy
	10	Bestrahlung	35 Gy
	10		40 Gy
	10		45 Gy
	10		50 Gy

Im einzelnen bedeuten hierbei

a) 6x7Gy/7d

Bestrahlung mit je 7 Gy an 6 aufeinanderfolgenden Tagen. Nach einem bestrahlungsfreien Tag Pause folgte die Testdosis.

b) 6x7Gy/30h

Sechsmalige Bestrahlung mit je 7 Gy im Abstand von 4 Stunden. Auch die Testdosis wurde nach einem Intervall von 4 Stunden verabreicht.

c) 6x7Gy/7d plus 6x7Gy/7d

Die Tumorgruppe wurde in der ersten Behandlungswoche mit je 7 Gy an 6 Tagen behandelt. Nach einem bestrahlungsfreien Tag wurde dieses Schema in der zweiten Woche wiederholt. Nach einem bestrahlungsfreien Tag folgte die Testdosis.

d) 6x7Gy/7d plus 6x7Gy/30h

Behandlung in der ersten Woche wie oben, danach lag das Zeitintervall zwischen den Fraktionen bzw. zur Testdosis bei 4 Stunden.

e) Einzeitbestrahlungen (= Testdosis allein).

Das Versuchskonzept beruht im Prinzip darauf, daß für eine erste und zweite Behandlungswoche jeweils der Effekt einer täglichen Bestrahlung mit dem einer möglichst kurzzeitigen Behandlung mit gleicher Fraktionszahl und Gesamtdosis verglichen wird.

Die tägliche Bestrahlung mit 7 Gy anoxisch dient als Modell der klinischen Behandlung, deren Wirksamkeit unter Umständen durch die in den Fraktionierungspausen ablaufende Repopulierung verringert wird. Durch die Verabreichung der gleichen Behandlung in einem kurzen Zeitraum kann der Einfluß der Repopulierung weitgehend ausgeschaltet beziehungsweise durch den Vergleich der Wirksamkeit gemessen werden.

Hierzu sind folgende Bedingungen zu beachten:

- Der Einfluß möglicher Reoxygenierung von hypoxischen Tumorzellen und damit störender zellulärer Sensibilitätsänderungen ist durch Einhalten anoxischer Bedingungen während jeder Bestrahlungssitzung auszuschließen.
- Das Intervall zwischen den Fraktionen muß auch bei Kurzzeitfraktionierung ausreichen, um volle Erholung vom subletalen Strahlenschaden zu gewährleisten (= 4h).
- Die Vergleichbarkeit wird erst durch Verabreichung von graduierten Testdosen hergestellt, die nach Abschluß der fraktionierten Bestrahlung gegeben werden. Durch sie wird außerdem erreicht, daß der Tumoreffekt, also die Wachstumsverzögerung, in einen meßbaren Bereich gebracht wird.

Auf Grund dieser Überlegungen soll letztlich durch den Vergleich isoeffektiver Testdosen in Gruppe a und b die Repopulierungsleistung in der ersten Woche gemessen werden. Diese wird durch ein Dosisinkrement ausgedrückt. Analog dazu wird die Repopulierungsleistung in der zweiten Woche durch den Vergleich der Untergruppen c und d quantifiziert.

2.7. Dokumentation der Tumorstrahlenwirkung

Die Messung der Tumorgröße erfolgte post radiationem wieder in regelmäßigen Intervallen, wobei sich wegen des auffallend langsamen Rezidivwachstums wöchentliche Abstände als vollkommen ausreichend erwiesen. Die Verlaufskontrollen erstreckten sich über einen Zeitraum zwischen 4 Wochen und 5 Monaten und wurden beendet, wenn jeweils etwa die zehnfache Ausgangsgröße erreicht war. Eine Störung des Allgemeinzustandes der Versuchstiere war bei dieser Tumormasse noch nicht ersichtlich.

Von jeder Dosisgruppe wurde eine Graphik mit den individuellen Tumorwachstumskurven erstellt. Hierfür wurde eine halblogarithmische Darstellung der auf die Behandlungsgröße (= 100%) normierten Tumormasse gegen die Zeit nach Bestrahlung gewählt. Als Behandlungsbeginn (Tag 0) galt der Tag der ersten Behandlung. In den Kontrollgruppen war der Tag 0 durch das Erreichen einer Größe zwischen 80 und 150 mg definiert, wobei die Größenverteilung ähnlich wie in den Versuchsgruppen randomisiert war.

Die Wachstumskurven wurden für jede Dosisgruppe durch eine Kombination folgender Verfahren zu Mittelwertskurven zusammengefaßt:

- a) Darstellung des geometrischen Mittelwertes des Gewichts als Funktion der Zeit, um in der ersten Zeit nach Bestrahlung den Gewichtsverlauf, der gerade hier großen Fluktuationen unterworfen war, zu erfassen.
- b) Bestimmung des geometrischen Mittelwertes der Latenzzeit bis zum Erreichen vorgegebener Tumorgrößen. Dieses Verfahren setzt Stetigkeit im Wachstumsverhalten voraus, um eine eindeutige Zuordnung von Tumorgröße und Wachstumsverzögerung zu gewährleisten.

Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die Mittelwerte und ihr mittlerer Fehler (Standard Error of the Mean, SEM) gleichzeitig die als Wachstumsverzögerung bezeichnete Meßgröße ergeben. Zudem gibt diese Darstellung die mittlere Neigung der Wachstumskurven unabhängig von der zeitlichen Spreizung der Rezidive korrekt wieder.

Dieses Vorgehen gestattet es also, das Wachstumsverhalten verschiedener Dosisgruppen in Form ihrer Mittelwertskurven in einer Abbildung zu vergleichen (43).

3. ERGEBNISSE

3.1. Histologie

Der folgende Abschnitt soll Einblick geben in

- a) die Histologie des Primärtumors,
- b) eventuelle Veränderungen im Verlauf der Passagierung,
- c) den histologischen Verlauf der Strahlenschädigung nach einer Einzeitdosis, die etwa der halben mittleren Heilungsdosis entspricht.

3.1.1. Primärtumor

Wie schon unter 2.2. erwähnt, entstand der mit der Arbeitsbezeichnung AT 55 versehene Primärtumor als radiogener Tumor bei der C3H-Maus. Er war im Bereich der vorderen Milchleiste lokalisiert und fiel durch seine relativ langsame Wachstumsgeschwindigkeit auf.

Histologisch setzt sich der Primärtumor überwiegend aus epithelialen Tumorverbänden, mit vereinzelt auch zystischen Anteilen, und Stroma zusammen. Bei Differenzierung nach dem histologischen Bild wäre der Primärtumor am ehesten als Carcinoma solidum simplex, oder auch schon als medulläres Karzinom (bei Vorherrschen der epithelialen Strukturen), einzuordnen. Die Tumorzellkerne imponieren als relativ uniform, klein und rundlich bis oval. Auch die Zellen selbst sind eher klein, die Kern-Plasma-Relation ist zugunsten des Kernes verschoben. Die Mitoserate ist eher niedrig.

Bei dem Primärtumor handelt es sich also in Anbetracht der Lokalisation und der histologischen Differenzierung am ehesten um ein Adenokarzinom der Mamma, das aber in weiten Teilen solide Anteile aufweist.

3.1.2. Spätere Passagen (unbestrahlt)

a) Passage 1

Der Anteil der drüsigen Formationen scheint im Vergleich zum Primärtumor etwas gestiegen zu sein. Die Tumorzellen sind zum Teil röhrenförmig, einem tubulär-duktalem Adenokarzinom entsprechend, zusammengelagert. Auch hier sind die Tumorzellverbände von faserreichen Stromazügen umgeben. Die einzelnen Tumorzellen sind klein und haben ein eosinophiles Zytoplasma. Intranukleär finden sich deutlich sichtbare häufig mehrfache Nukleoli. Die Drüsenlumina sind größtenteils sekretgefüllt.

b) Passage 3

Das für Passage 1 beschriebene Bild bestätigt sich auch bei weiterer Passagierung. Das Verhältnis von epithelialen Tumorverbänden und Stroma verlagert sich weiter zugunsten der epithelialen Geschwulstanteile. Zusätzlich finden sich zahlreiche kleine Nekroseherde.

Zusammenfassend kann man sagen, daß das untersuchte Karzinom bei Passagierung eher deutlichere Differenzierung mit einer Zunahme der tubulär-drüsigen Anteile zeigt. Der Tumor wird nicht vermehrt anaplastisch, auch die Polymorphie verstärkt sich nicht.

3.1.3. Histologische Veränderungen nach Bestrahlung

Um die Strahlenreaktion des Tumors nicht nur makroskopisch, sondern auch histologisch zu untersuchen, wurden Tumoren aus der Passage 4 mit jeweils 40 Gy (an-

oxisch) bestrahlt. In Zeitintervallen von jeweils ca. 4 Tagen wurde zwischen dem 4. und 54. Tag nach Bestrahlung je ein Tumor exzidiert und histologisch aufgearbeitet. Wie aus der Mittelwertskurve der Abbildung 5 hervorgeht, zeigt der Tumor nach dieser Dosis im Durchschnitt eine Regression bis auf etwa 80 % der Behandlungsgröße. Diese Regressionphase geht jedoch nach ca. einem Monat in ein definitives Rezidivwachstum über. Die initiale Schrumpfungs- und die spätere Wiederwachstumsphase werden mit dem Beobachtungszeitraum von 54 Tagen also ausreichend erfaßt.

In den ersten ein bis zwei Wochen nach Bestrahlung bleibt die Grundstruktur des unbehandelten Tumors weitgehend erhalten. Auffällig sind vereinzelt Zellschwellungen und Kernschwellungen. Viele Drüsenlumina sind mit Zelldetritus (nekrotischem Tumorgewebe) gefüllt. Etwa 14 Tage post radiationem nimmt der Drüsenanteil ab, die Drüsenlumina werden kleiner. Nekroseherde unterschiedlicher Größe sind von Granulationsgewebe umgeben und werden von peripher organisiert. Im Bereich der Nekrosen liegende, pyknotische und stark basophile Kerntrümmer sind Zeichen für Zelluntergang. Die Einsprossung von Fibroblasten führt zu einer Zunahme der bindegewebigen Strukturen und zur Entstehung von Narbengewebe. In dieser Phase zeigt der Tumor makroskopisch deutliche Regression, histologisch sind jedoch auch hier Anteile vital erscheinenden Tumorepithels nachweisbar. Drei bis vier Wochen nach Bestrahlung ist devitalisiertes Tumorgewebe weitgehend abgeräumt und bindegewebig ersetzt. Besonders in den Randbereichen des Karzinoms findet sich vermehrt fibrotisches Gewebe. Noch immer sind Mikronekrosen nachweisbar. Nach ein bis eineinhalb Monaten sind Tumorgewebe und Narbengewebe wieder gut abgrenzbar.

Epitheliale Tumoreale, die nach wie vor Züge eines Adenokarzinoms tragen, liegen inselförmig in hyaliniertem Narbengewebe. Die Tumorzellkerne sind, verglichen mit denen des unbehandelten Tumors, etwas größer, polymorpher und polychromatischer. Eine erhöhte Mitoserate deutet auf erneute Tumorzellproliferation hin und geht mit dem Beginn der auch makroskopisch meßbaren Rezidivphase parallel. Am Ende der histologischen Beobachtungszeit nach 54 Tagen nehmen ähnlich wie im unbehandelten Tumor die drüsig differenzierten Tumorgewebsinseln wieder einen größeren Anteil ein.

3.1.4. Autoradiographisches Proliferationsmuster

Um die zelluläre Proliferation im Tumor AT 55 zu untersuchen, wurden drei unbestrahlte Kontrollen mit radioaktivem ^3H -Thymidin durch i.p.-Injektion markiert (Amersham-Buchler, Braunschweig, Spez. Akt. . 2-5 Ci/mmol). ^3H -Thymidin wird in S-Phase-Zellen inkorporiert und kann hier autoradiographisch sichtbar gemacht werden. Der Anteil von markierten Zellen in einer definierten Zellpopulation gibt Aufschluß über die zelluläre Neubildungsrate (38).

In Abbildung 1 ist ein HE-gefärbtes Autoradiogramm dargestellt. Die Verteilung der markierten Zellen im Tumorgewebe ist weitgehend regelmäßig. In der direkten Umgebung von Kapillaren scheint der Anteil der markierten Zellen leicht erhöht. Auch im bindegewebigen Stroma sind, wenn auch deutlich weniger, radioaktiv markierte Zellen nachweisbar.

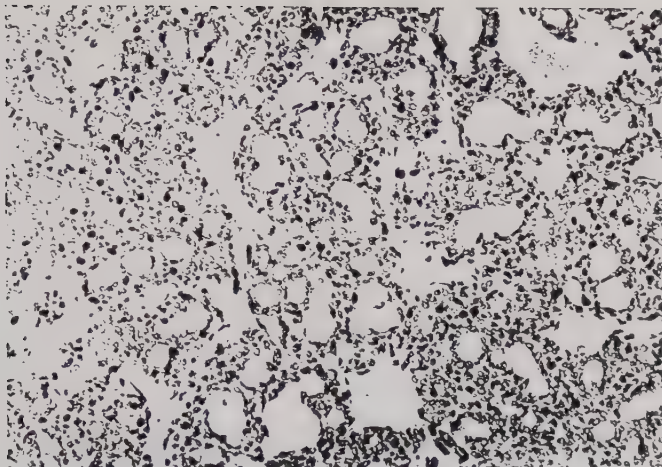


Abb. 1: Autoradiogramm eines unbehandelten Tumors nach ^3H -Thymidin-Pulsmarkierung (HE, x150). Markierte Zellen verteilen sich weitgehend regelmäßig im Tumorparenchym.

Für die Auswertung war die Anzahl der Silberkörner über einem Zellkern entscheidend. Als radioaktiv markiert galten die Zellen, deren Kern mit mindestens 4 bis 5 Silberkörnern überlagert war (3). Unter einem Lichtmikroskop wurden mittels eines Okularfadenkreizes über das HE-gefärbte Präparat Schnittlinien gelegt und pro Tumor von zwei Schnitten je ca. 1000 Zellen (von der Zähllinie getroffene Kerne) ausgezählt. Der Markierungsindex (LI) bezeichnet den Quotienten aus markierten und gesamten Tumorzellen.

Tumor		<u>Markierte Zellen</u>	LI %
		Gesamtzellen	
1	Präparat a	142/1020	13,9
	" b	145/1064	13,6
2	Präparat a	161/1024	15,7
	" b	145/1011	14,3
3	Präparat a	188/1010	18,6
	" b	165/1045	15,8
		Mittelwert	15,3

Tab. 1: Markierungsindex in 3 unbehandelten Tumoren
(Größe ca. 100 mg) nach ^3H -Thymidin-Puls-
markierung.

Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, bewegt sich der Markierungsindex des Tumors AT 55 in einem relativ engen Bereich zwischen 13,6 und 18,6 %, mit einem Mittelwert von $15,3 \pm 1,85$ % (SD).

3.2. Größenwachstum der unbehandelten Tumoren (Versuch A)

Untersucht wurden die Tumorpassagen 1 bis 8. Bei allen hier aufgeführten Fällen handelt es sich um unbestrahlte Tumoren; spontane Rückbildungstendenz wurde nicht beobachtet.

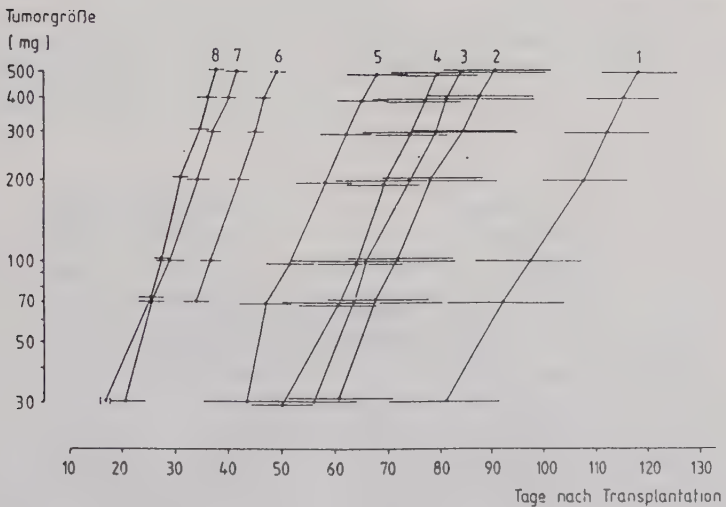


Abb. 2: Gemittelte Wachstumskurven von unbestrahlten Tumoren aus den Passagen 1 bis 8. Angabe der Passage an den Kurven.

Abbildung 2 verschafft anhand von Mittelwertskurven einen Überblick über das Wachstumsverhalten unbehandelter Tumoren. Aus den Kurven ist ersichtlich, daß mit steigenden Passagezahlen die Latenzzeit bis zum Erreichen von 100 mg Tumormasse nahezu stetig abnimmt. Weniger eindrucksvoll, aber ebenfalls nachweisbar, ist eine durchschnittliche Zunahme der Wachstumsrate (vergleiche hierzu auch Tabelle 2). Gleichzeitig weisen die bei zunehmender Passagierung abnehmenden Streuungen auf eine steigende Synchronisation des Tumorwachstums hin.

Die genauen Werte für Latenzzeit und Verdopplungszeit sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Passage	Latenzzeit (T 100)	Verdopplungszeit (T100/200)
1	97,1 (86,7-108,8)	9,2 (7,0-12,2)
2	72,1 (63,0- 82,6)	6,4 (5,5- 7,5)
3	66,6 (58,4- 75,9)	8,6 (7,5- 9,6)
4	63,8 (56,1- 72,5)	6,5 (5,7- 7,3)
5	51,3 (46,5- 56,6)	7,6 (6,7- 8,6)
6	35,6 (33,6- 37,7)	6,0 (5,2- 6,9)
7	29,6 (27,1- 32,2)	5,8 (5,3- 6,4)
8	29,3 (26,8- 32,2)	4,4 (4,1- 4,7)

Tab. 2: Latenzzeit bis zum Erreichen von 100 mg Tumormasse (T 100) und Verdopplungszeit von 100 auf 200 mg (T 100/200) für unbehandelte Tumoren der Passagen 1 bis 8. Die Werte geben jeweils den geometrischen Mittelwert in Tagen ($\pm$ SEM) an.

3.3. Temporäre Ischämie und Tumorwachstum (Versuch B)

Wie unter 2.7. beschrieben, wurde der Einfluß des Abklemmens und der daraus resultierenden Anoxie auf das Wachstumsverhalten der Tumoren untersucht. Um eventuelle Folgen für das Tumorwachstum darzustellen, wurden zwei parallele Versuchsgruppen aus der Passage 5 zu jeweils 8 Tieren gebildet. Die Tiere der Gruppe 1 blieben unbehandelt, bei den Tieren der Gruppe 2 wurde der Tumor dreimal im Abstand von 4 Stunden (in Hexobarbitalnarkose) abgeklemmt. Zum Behandlungszeitpunkt betrug die zwischen der unbehandelten und abgeklemmten Gruppe randomisierte Tumorgröße zwischen 80 und 150 mg, was der Größe der in den übrigen Versuchen bestrahlten Tumoren entsprach.

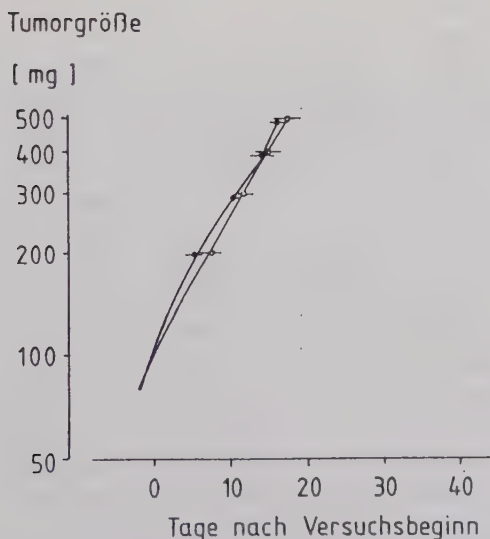


Abb. 3: Normierte mittlere Wachstumskurve von unbehandelten Tumoren (o) bzw. nach dreimaligem Abklemmen für 15 Minuten im Abstand von 4 Stunden (●).

Aus Abbildung 3 läßt sich ablesen, daß die Tumorverdopplungszeit T 100/200 für die unbehandelte Gruppe 1 bei 7,6 (6,7 - 8,6) Tagen lag. Zu einer Vervierfachung des Tumorgewichtes T 100/400 war bei Gruppe 1 ein Zeitraum von 15,0 (13,6 - 16,6) Tagen und bei Gruppe 2 von 14,3 (13,0 - 15,7) Tagen notwendig. Ein signifikanter Einfluß der Abklemmung und der Anoxie bzw. der wiederholten i.p. Injektion von Hexobarbital läßt sich somit ausschließen.

Thematisch in die gleiche Richtung geht ein weiterer Versuch. Er behandelt den eventuellen Einfluß von 3 Ischämieperioden, die zusätzlich zu 3 anoxischen Bestrahlungsfractionen gegeben wurden, mit der Fragestellung, ob eventuell bei höherer Zahl von Bestrahlungsfractionen durch das verschieden häufige Abklemmen ein Versuchseffekt induziert wird.

Das Bestrahlungsschema war in beiden Versuchsgruppen identisch und umfaßte in Gruppe 1 und 2 Bestrahlung unter Abklemmen und Anoxie in jeweils vierstündigem Fraktionsintervall. In Gruppe 2 wurden am Vortag der Bestrahlung 3 zusätzliche Ischämieperioden von je 15 min im Abstand von 4 Stunden gesetzt. Jede einzelne Dosisgruppe (3 x 14 Gy, 3 x 19 Gy, 3 x 23 Gy) setzte sich aus 8 Tieren zusammen.

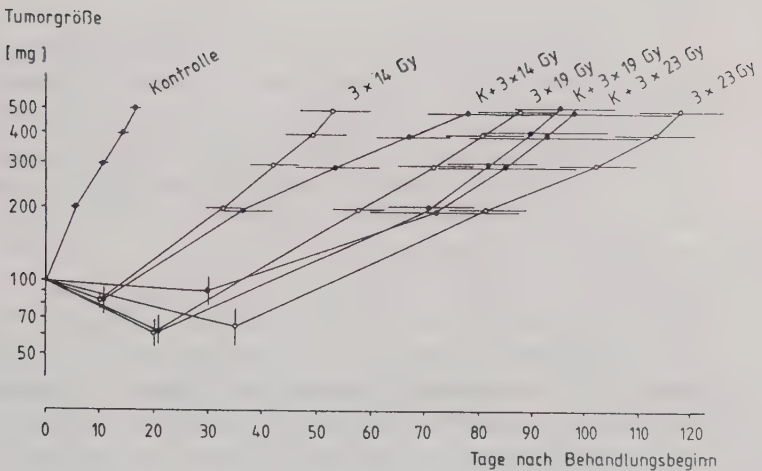


Abb. 4: Mittelwertkurven von Tumoren nach fraktionierter Bestrahlung mit 3 x 14, 19 oder 23 Gy (o) bzw. nach zusätzlichem dreimaligen Abklemmen am Tag vor fraktionierter Bestrahlung (●).

Bei erster Betrachtung zeigen die Mittelwertkurven gleicher Dosisgruppen erhebliche Unterschiede. Wenn man die Streuung der Meßwerte, die sich häufig beträchtlich überlappen, mit berücksichtigt, bleibt jedoch kein signifikanter Effekt der zusätzlichen Abklemmperioden auf das Tumorstadium nachweisbar. Die Wachstumsverzögerung der zusätzlich geklemmten Tumoren ist in den Dosisgruppen 3 x 14 Gy und 3 x 19 Gy höher, in der Dosisgruppe 3 x 23 Gy niedriger als in den jeweiligen Vergleichsgruppen. Eine deutliche Beeinflussung des Tumorstadiums durch zusätzliches Abklemmen in Verbindung mit nachfolgender Bestrahlung kann also nicht festgestellt werden.

3.4. Ergebnisse des Vorversuchs (Fraktionierungseffekt) (Versuch C)

Die Strahlenreaktion des Tumorsystems AT 55 wird in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Dem eigentlichen Hauptversuch wurde daher ein auf Einzeldosen und vierfach fraktionierte Dosen begrenzter Vorversuch vorangestellt. Er sollte einen Überblick über das Wachstumsverhalten des bestrahlten Tumors, den verwendbaren Dosisbereich und den Effekt einer Fraktionierung geben.

Zu diesem Zweck wurden 2 Versuchsgruppen aufgestellt. Die eine wurde mit Einzeldosen zwischen 10 und 50 Gy, die andere mit 4 Fraktionen im Abstand von jeweils 4 Stunden in der Größenordnung von $4 \times 3,5$ Gy bis 4×17 Gy behandelt. Die Meßwerte jeder Dosisgruppe wurden, wie unter 2.8. beschrieben, graphisch dargestellt.

3.4.1. Wachstumsverhalten der bestrahlten Tumoren

Abbildung 5 zeigt die gemittelten Wachstumskurven von Tumoren, die unter anoxischen Verhältnissen mit Einzeldosen zwischen 10 und 50 Gy bestrahlt und bis zum Erreichen der mindestens fünffachen Behandlungsgröße verfolgt wurden.

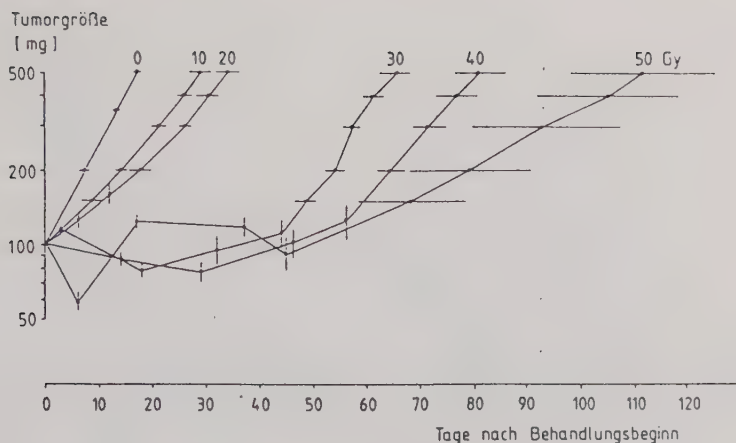


Abb. 5: Gemittelte Wachstumskurven nach Einzeldosen. Dosisangaben an den Kurven.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, ist das Wachstumsverhalten dosisabhängig. Die Wachstumsgeschwindigkeit der mit 10 bzw. 20 Gy behandelten Tumoren nahm zunächst ab, näherte sich aber im Verlauf des Beobachtungszeitraumes wieder der Geschwindigkeit der unbestrahlten Kontrollgruppe. Die Dosisgruppen 30 und 40 Gy zeigten eine langsame Regression auf etwa 80% der Ausgangsgröße, die bis zur 6. bzw. 7. Woche wieder ausgeglichen war. Nach Überwinden dieser Phase war die Wachstumsrate durchaus der in den niedrigen Dosisgruppen vergleichbar. Nach Dosen von 50 Gy zeigte der Größenverlauf stärkere Fluktuationen und trat etwa um die 7. Woche in ein stetiges, annähernd exponentielles Wiederwachstum ein, allerdings mit deutlich verlangsamter Wachstumsrate. Die Wachstumsgeschwindigkeit in der Rezidivphase läßt sich in erster Näherung durch die Verdopplungszeiten von 200 auf 400% der Ausgangsgröße veranschaulichen. Diese Werte sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Abbildung 6 zeigt die Mittelwertkurven nach fraktionierter Bestrahlung mit Dosen zwischen 4 x 3,5 und 4 x 17 Gy.

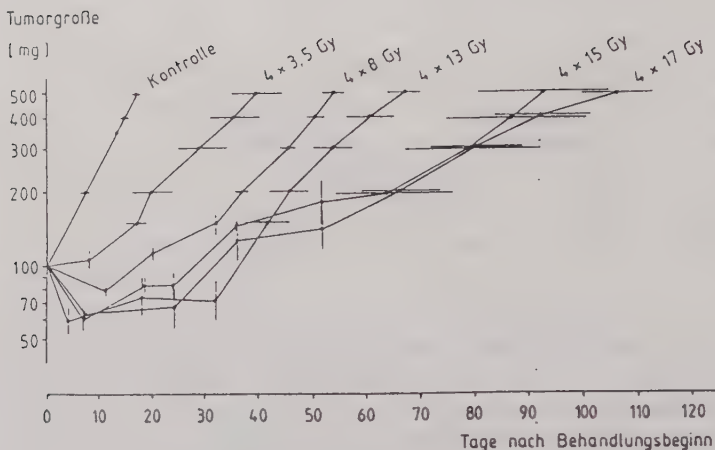


Abb. 6: Gemittelte Wachstumskurven nach Bestrahlung mit je 4 Fraktionen. Dosisangaben an den Kurven.

Die Kurvenverläufe lassen mit Ausnahme der Dosisgruppe von 4 x 3,5 Gy eine Regression unter die Ausgangsgröße erkennen, die allerdings zwischen 4 x 13 Gy und 4 x 17 Gy keine dosisabhängigen Unterschiede aufweist. Sie besteht in einer Schrumpfung auf etwa 60 bis 80 % der Behandlungsgröße und hält ca. 4 Wochen an. Das Wiederwachstum erfolgt in den Dosisgruppen bis 4 x 13 Gy mit annähernd derselben Wachstumsrate, in den höheren Dosisgruppen ist es deutlich verlangsamt.

Die in der nachfolgenden Tabelle 3 zusammengefaßten Werte der Verdopplungszeiten von 200 auf 400% der Ausgangsgröße ($T_{200/400}$) verdeutlichen auch hier die Wiederwachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Dosisgruppen.

Dosis	T 200/400
1 x 0 Gy (unbestrahlt)	7,2 (5,7- 9,1)
10 Gy	11,5 (10,6-12,4)
20 Gy	12,3 (10,9-13,9)
30 Gy	7,3 (6,6- 8,2)
40 Gy	11,6 (9,6-14,0)
50 Gy	25,3 (23,0-27,9)
4 x 3,5 Gy	13,2 (10,5-16,5)
8 Gy	13,6 (11,7-16,8)
13 Gy	15,2 (13,4-17,2)
15 Gy	21,1 (18,7-24,0)
17 Gy	26,0 (23,2-29,1)

Tab. 3: Wachstumsdauer zur Verdopplung von 200 auf 400% der Ausgangsgröße nach Einzeldosen von 0 bis 50 Gy und nach 4 Fraktionen mit Dosen zwischen 3,5 und 17 Gy je Fraktion.

3.4.2. Quantifizierung der Wachstumsverzögerung

Der Verlauf der Wachstumskurven macht deutlich, daß die Regression zur Beschreibung einer dosisabhängigen Wirkung ungeeignet ist. Auch in der Rezidivwachstumsphase scheint die Ableitung einer Wachstumsverzögerung (d.h. der Zeit, die ein Tumor nach Bestrahlung bis zum Erreichen einer vorgegebenen Rezidivgröße braucht) noch wesentlich von der gewählten Rezidivgröße abhängig.

Die Analyse der Wachstumsverzögerung kann prinzipiell auf verschiedenen Niveaus erfolgen:

Ein hoher Endpunkt, zum Beispiel bei 400 mg Tumorgröße (T 400), bietet den Vorteil, daß initiale Wachstumschwankungen, wie sie strahlenbedingte Regression oder Wachstumsverlangsamung bewirken, nicht eingehen.

Ein niedriger Level (T 200) schließt im Gegensatz dazu spätere Wachstumsretardierungen weitgehend aus.

Die folgende Tabelle listet die Werte der Wachstumsverzögerungen für alle einzeit- und fraktioniert bestrahlten Dosisgruppen auf. Die Werte bezeichnen den geometrischen Mittelwert mit dem dazugehörigen Standard Error of the Mean (SEM).

Bestrahlungsdosis
anoxisch

Zeit zum Erreichen der zwei-
fachen Behandlungsgröße (Tage)

1 x	0	Gy	7,5 (6,7- 8,6)
	10	Gy	14,3 (13,6-15,1)
	20	Gy	17,6 (15,5-20,1)
	30	Gy	54,1 (52,3-55,9)
	40	Gy	64,3 (61,5-67,1)
	50	Gy	79,0 (68,3-91,3)
4 x	3,5	Gy	19,8 (16,2-24,1)
	8	Gy	37,0 (35,4-38,6)
	13	Gy	45,9 (42,8-49,0)
	15	Gy	64,1 (53,9-76,1)
	17	Gy	66,1 (59,2-73,9)

Tab. 4: Wachstumsdauer bis zum Erreichen der doppelten Ausgangsgröße (T 200) in Tagen (geometrischer Mittelwert $\pm$ mittlerer Fehler (SEM)).

Bestrahlungsdosis
anoxisch

Zeit zum Erreichen der vier-
fachen Behandlungsgröße (Tage)

1 x	0	Gy	15,0 (13,6- 16,5)
	10	Gy	26,0 (24,7- 27,3)
	20	Gy	30,1 (28,4- 31,9)
	30	Gy	61,1 (59,5- 62,8)
	40	Gy	76,5 (72,4- 80,9)
	50	Gy	104,8 (92,4-118,8)
4 x	3,5	Gy	35,5 (31,2- 40,6)
	8	Gy	50,3 (48,8- 51,9)
	13	Gy	60,6 (56,6- 64,9)
	15	Gy	86,9 (74,7-101,2)
	17	Gy	92,2 (83,5-101,9)

Tab. 5: Wachstumsdauer bis zum Erreichen der vierfachen Ausgangsgröße (T 400) in Tagen (geometrischer Mittelwert $\pm$ mittlerer Fehler (SEM)).

Bei graphischer Auftragung der Wachstumsdauer in Tagen gegen die Gesamtdosis ergibt sich die Dosiseffektcurve der Wachstumsverzögerung. Man erhält für die Endpunkte T 200 und T 400 den in Abbildung 7 gezeigten Verlauf.

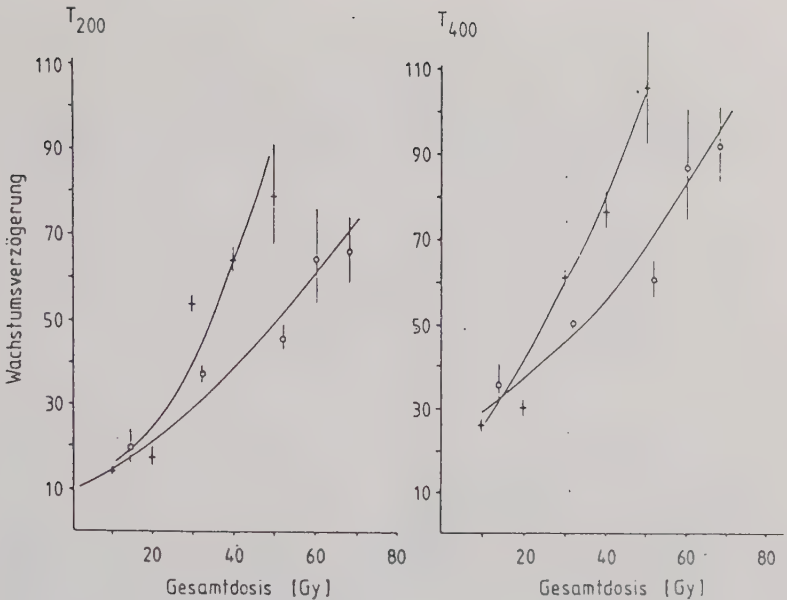


Abb. 7: Wachstumsdauer bis zum Erreichen der zweifachen bzw. vierfachen Behandlungsgröße (T_{200} bzw. T_{400}) nach Einzeitbestrahlung (+) und Bestrahlung mit 4 Fraktionen (o).

Beide Kurven der linken Abbildung haben eine parabelähnliche Gestalt und schneiden die Ordinate bei einem Wert, der der Verdopplungszeit des unbehandelten Tumors entspricht. Im niedrigeren Dosisbereich haben beide eine geringere Steigung, die jedoch mit wachsender Dosis zunimmt. Diese Zunahme ist in der Kurve der einzeitbestrahlten Tumoren deutlich größer als bei den fraktioniert behandelten, sodaß bei steigender Gesamtdosis die Kurven zunehmend auseinanderweichen.

Das rechte Teilbild weist im Prinzip dieselben Charakteristika auf. Hier ist aber zu bemerken, daß sich die Kurven unter Berücksichtigung des $4 \times 3,5$ Gy Wertes im unteren Dosisbereich überschneiden und daher nicht auf den gleichen Ausgangswert bei der Dosis 0 extrapoliert werden können. Dieses Phänomen läßt sich durch die höhere Anfälligkeit des Endpunkts T 400 für Veränderungen der Wachstumsrate (überproportionale Verlangsamung nach $4 \times 3,5$ Gy bzw. relativ geringe Verlangsamung nach 20 Gy) erklären und macht deutlich, daß die Wahl des Endpunktes kritisch vorgenommen werden muß.

3.5. Repopulierungsversuch

Wie in 2.6.D beschrieben, dient dieser Versuch der Messung der Repopulierungsleistung in einer ersten und zweiten Behandlungswoche mit quasi-klinischer (täglicher) Bestrahlung.

3.5.1. Wachstumsverhalten nach Bestrahlung

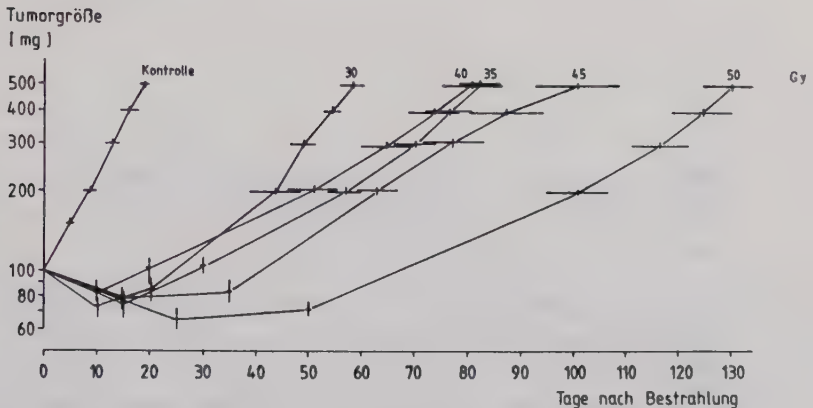


Abb. 8: Mittelwertkurven von einzeitbestrahlten Tumoren. Dosisangaben an den Kurven.

Aus der Abbildung 8 wird deutlich, daß die initiale Volumenreaktion nach Einzeitbestrahlung keine dosisabhängigen Effekte aufweist. Die Tumoren der einzelnen Gruppen schrumpften etwa auf Werte zwischen 65 und 85 % der Ausgangsgröße. Nach Überwinden der vorübergehenden Tumorregression steigen die Mittelwertskurven mit unterschiedlicher Geschwindigkeit bis zur Endbeobachtungsgröße von 500 mg an. Das schnellste Wiederwachstum und

somit die größte Wachstumsrate zeigen die mit 30 Gy behandelten Tumoren. Die Wachstumsrate der mit 35 bis 45 Gy bestrahlten Karzinome ist nach Überwinden der unterschiedlich langen Regressionsphase annähernd gleich. Im Gegensatz dazu verläuft die Wachstumskurve nach Bestrahlung mit 50 Gy deutlich flacher, das heißt die Wachstumsrate ist nach dieser hohen Einzeldosis deutlich vermindert.

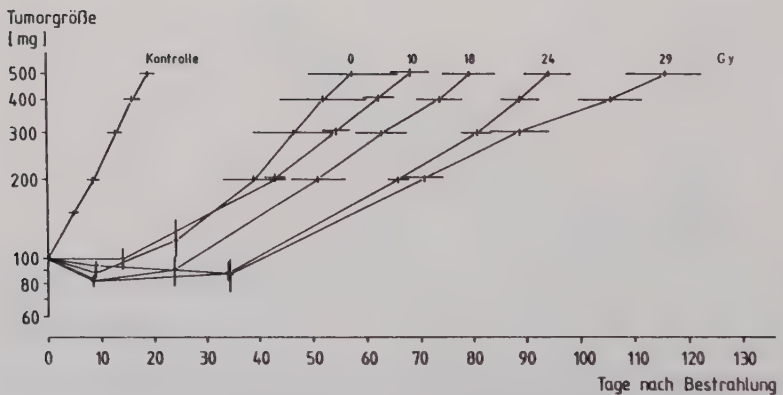


Abb. 9: Mittelwertskurven der Tumoren nach Bestrahlung mit 6x7Gy plus Testdosis in 30 h. Angabe der Testdosis an den Kurven.

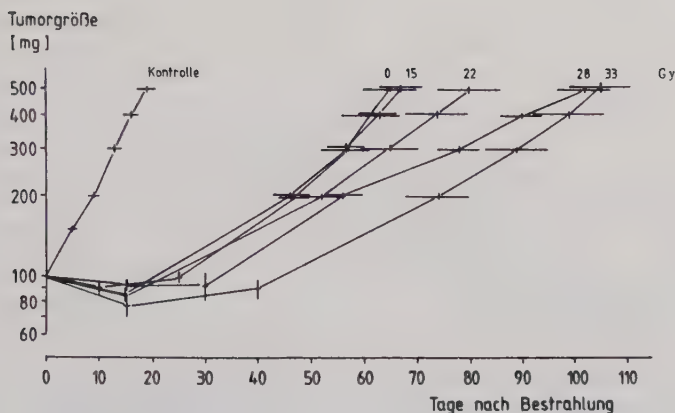


Abb. 10: Mittelwertskurven der Tumoren nach Bestrahlung mit $6 \times 7 \text{ Gy} / 7 \text{ d}$ + Testdosis. Angabe der Testdosis an den Kurven.

Wie oben schon erwähnt, liegt der Hauptunterschied beider Gruppen nicht im gewählten Dosisbereich, sondern im Gesamtbehandlungszeitraum (1,5 vs. 7 Tage). Bei vergleichender Betrachtung der Abbildungen 9 und 10 ergibt sich, daß prinzipiell das Wachstumsverhalten gleich ist. Die in diesen beiden parallel angelegten Teilversuchen behandelten Tumoren haben eine nur geringe Regressions-tendenz auf Werte um etwa 80 mg, die annähernd dosis-abhängig nach ca. 2 Wochen bis maximal 40 Tagen überwunden ist. Das anschließende Wiederwachstum verläuft im allgemeinen mit steigender Testdosis zunehmend langsamer. Beide Effekte tragen dazu bei, daß das Aufwachsen der Tumoren bis zum Endbeobachtungsgewicht von 500 mg dosis-abhängig später erreicht wird. Dies wird in Abbildung 11 deutlich, in der die Mittelwertskurven beider Versuche zusammenfassend dargestellt sind.

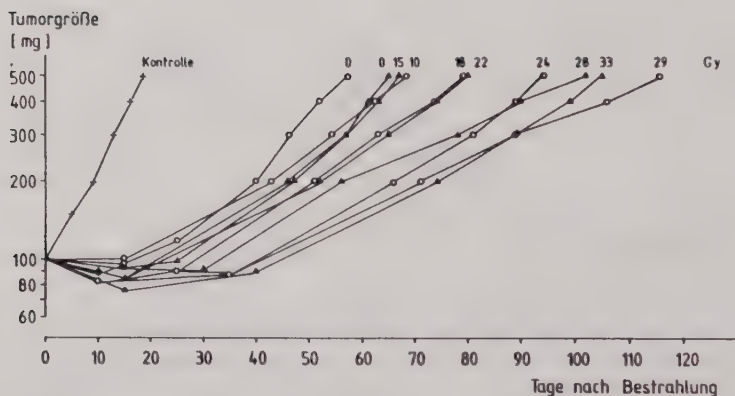
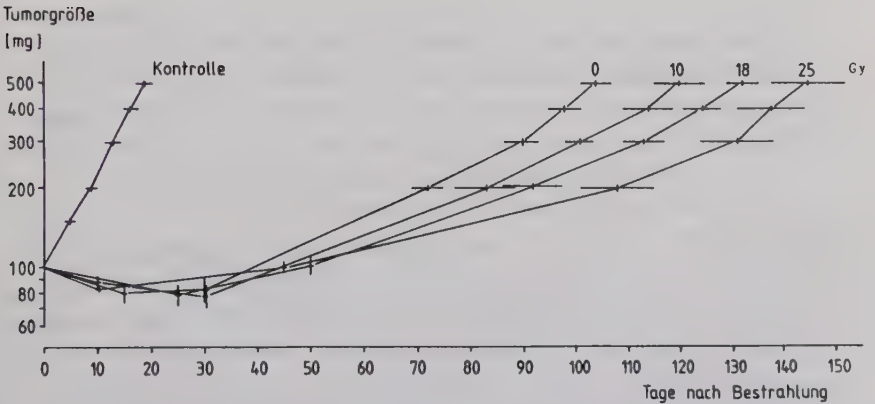
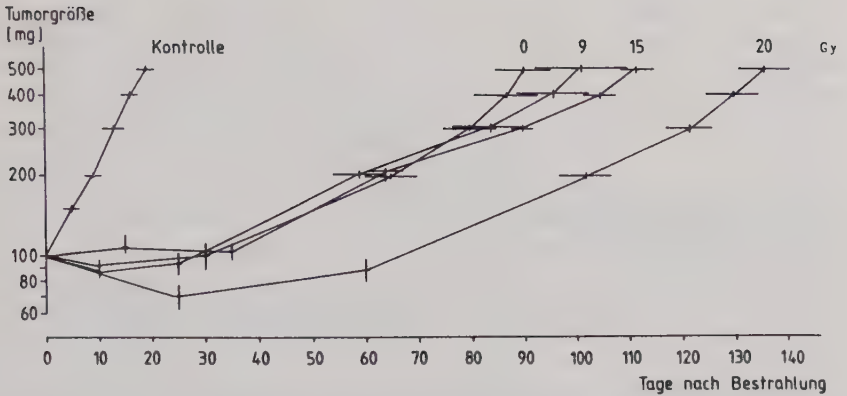


Abb. 11: Mittelwertskurven nach Bestrahlung mit $6 \times 7 \text{ Gy}/7 \text{ d}$ + Testdosis ($\blacktriangle$), bzw. nach Bestrahlung mit $6 \times 7 \text{ Gy}/30 \text{ h}$ + Testdosis ($\circ$). Angabe der Testdosis an den Kurven.

In eine Abbildung zusammengefaßt zeigen die Wachstumskurven beider Teilversuche im Bereich kleiner Testdosen generell kürzere Regressionsphasen und ein schnelleres Wiederwachstum als bei höheren Testdosen, wo die Regressionsphase länger und die Wachstumsrate geringer ist. Bei Beschreibung der Abbildung 11 läßt sich aber auch feststellen, daß das Wachstumsverhalten des Tumors nicht nur von der Höhe der applizierten Strahlendosis, und also auch nicht nur von der Testdosis abhängig ist. Einen entscheidenden Einfluß hat ebenso, ob der Tumor kompakt ($6 \times 7 \text{ Gy}/30 \text{ h}$) oder in täglichen Intervallen vorbehandelt wurde. Das Wachstum der kompakt vorfraktionierten Tumoren wurde im allgemeinen schon bei vergleichbar niedrigeren Testdosen auf ein Maß reduziert, für das man bei den täglich bestrahlten Tumoren eine höhere Testdosis benötigte, um den gleichen Effekt bezüglich der Wachstumsverzögerung zu erzielen.



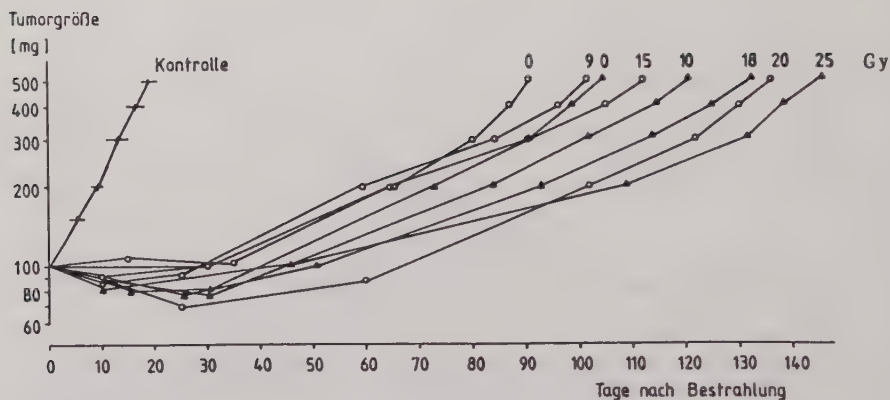


Abb.14: Wachstumskurven nach Bestrahlung mit $6 \times 7 \text{ Gy}/7 \text{ d} + 6 \times 7 \text{ Gy}/7 \text{ d} + \text{Testdosis } (\blacktriangle)$ bzw. nach Bestrahlung mit $6 \times 7 \text{ Gy}/7 \text{ d} + 6 \times 7 \text{ Gy}/30 \text{ h} + \text{Testdosis } (o)$. Angabe der Testdosis an den Kurven.

Die Wachstumskurven der Abbildungen 12 und 13 zeigen das Wachstumsverhalten des Tumors nach Bestrahlung in der ersten Behandlungswoche mit jeweils $6 \times 7 \text{ Gy}/7 \text{ d}$. In der zweiten Woche wurden die Tumoren mit $6 \times 7 \text{ Gy}/30 \text{ h}$ (Abb. 12) bzw. erneuten $6 \times 7 \text{ Gy}/7 \text{ d}$ (Abb. 13) mit jeweils abschließender Testdosis bestrahlt.

Grundsätzlich weisen die Mittelwertskurven dieser Teilversuche die gleichen Charakteristika auf wie sie für die einmalige Fraktionierung mit $6 \times 7 \text{ Gy}$ beschrieben wurden (Abb. 9 und 10). Es ergibt sich bei fast allen Dosisgruppen eine mäßige Regression auf maximal 70% der Behandlungsgröße. Die Dauer dieser Phase ist im allgemeinen dosisabhängig. Der initiale Größenanstieg ist langsam. Bei den in der zweiten Woche kompakt fraktionierten Tumoren (Abb. 12) verlaufen die drei Testdosisgruppen 0, 9 und 15 Gy bis etwa 300 mg noch weitgehend ähnlich, erst bei weiterer Volumenzunahme fächern sie sich auf. Bei den

durchgehend täglich bestrahlten Tumoren (Abb. 13) splitten die Kurven bereits mit dem Wiedererreichen der Ausgangsgröße dosisabhängig. Im übrigen zeigen die meisten Mittelwertskurven bei einem Tumorgewicht von 300 mg eine merkliche Wachstumsbeschleunigung, die sich z.T. bei Erreichen von 400 mg erneut verstärkt.

Betrachtet man alle Mittelwertskurven gemeinsam (Abb. 14) so wird deutlich, daß die Wachstumsrate über 200 mg mit zunehmender Latenzzeit T 200 gleichmäßig und unabhängig vom Behandlungsmodus abnimmt.

3.5.2. Quantifizierung der Wachstumsverzögerung

Der Effekt der unterschiedlichen Testdosen in den einzelnen Versuchsreihen kann durch Auftragen der Wachstumsdauer gegen die Testdosis dargestellt werden. Die vorhergehenden Abbildungen zeigen, daß das niedrigste Größenniveau zur Ableitung der Wachstumsverzögerung die zweifache Ausgangsgröße darstellt. Insgesamt ist die Auflösung der Kurven jedoch bei der dreifachen Ausgangsgröße am besten. In den Mittelwertskurven wurde bisher das Tumorstadium auf den Tag der ersten Bestrahlung normiert. Die Wachstumsdauer wird jedoch entscheidend von der Testdosis beeinflusst, die den Bestrahlungszeitraum abschließt und gleichzeitig, besonders bei höheren Testdosiswerten, den Dosiseffekt entscheidend mitbedingt.

Die nachfolgende Tabelle gibt den geometrischen Mittelwert ($\bar{X}$) mit mittlerem Fehler des Mittelwertes ($\pm$ SEM) der regrowth delays aller Dosisgruppen bei der dreifachen Behandlungsgröße (T 300) an. Dabei ist $\bar{X}$ sowohl für den ersten Tag der Behandlung als auch zum Zeitpunkt der Testdosis aufgeführt.

Bestrahlungs- protokoll Einzeldosis	Wachstumsdauer T 300 bezogen auf	
	1. Behandlungstag	Zeitpunkt der Testdosis
30 Gy	49,1 (46,8-51,4)	Anmerkung: Bei Einzeitbestrahlun- gen sind der Tag der 1. Behandlung und der Tag der Testdosis identisch.
35 Gy	70,3 (66,5-74,5)	
40 Gy	64,9 (60,2-69,9)	
45 Gy	77,4 (71,8-83,5)	
50 Gy	116,7 (111,7-121,9)	
6x7Gy/30h+		
Testdosis (TD)		
0 Gy TD	47,4 (40,4-55,6)	45,9 (38,9-54,1)
10 Gy TD	55,7 (53,3-59,2)	54,2 (51,8-57,7)
18 Gy TD	63,9 (59,6-68,6)	62,4 (58,1-67,1)
24 Gy TD	82,3 (79,1-85,7)	80,8 (77,6-84,2)
29 Gy 1D	89,8 (85,2-94,7)	88,3 (83,7-93,2)
6x7Gy/7d +		
Testdosis (TD)		
0 Gy TD	56,9 (52,2-62,1)	49,9 (45,2-55,1)
15 Gy TD	56,8 (53,4-60,4)	49,8 (46,4-53,4)
22 Gy TD	65,7 (59,9-72,0)	58,7 (52,9-65,0)
28 Gy TD	77,9 (74,3-81,8)	70,9 (67,3-74,8)
33 Gy TD	89,5 (83,7-95,6)	82,5 (76,7-88,6)
6x7Gy/7d +		
6x7Gy/30h +		
Testdosis (TD)		
0 Gy TD	79,9 (75,2-84,9)	71,4 (66,7-76,4)
9 Gy TD	84,1 (77,6-91,2)	75,6 (69,1-82,7)
15 Gy TD	90,2 (87,9-92,6)	81,7 (79,4-84,1)
20 Gy TD	122,4 (117,6-127,4)	113,9 (109,1-118,9)
6x7Gy/7d +		
6x7Gy/7d +		
Testdosis (TD)		
0 Gy TD	89,9 (86,6-93,4)	75,9 (72,6-79,4)
10 Gy TD	102,3 (97,9-106,9)	88,3 (83,9-92,9)
18 Gy TD	113,1 (108,8-117,5)	99,1 (94,8-103,5)
25 Gy TD	131,5 (124,0-139,4)	117,5 (110,0-125,4)

Tab. 6: Mittlere Wachstumsdauer (+ SEM) bis zum Erreichen der dreifachen Ausgangsgröße (T 300) berechnet vom Tag der 1. Bestrahlung und vom Tag der Testdosis.

In Tabelle 6 werden für alle Dosisgruppen auch korrigierte Werte gegeben, die die Wachstumsdauer vom Tag der Testdosis an beschreiben. Die unterschiedlich lange Behandlungszeit (30 h vs 7 d) in der ersten Woche und bei gleicher Vorbestrahlung auch in der zweiten Woche wird dadurch eliminiert. Da letztlich die aus der fraktionierten Vorbehandlung resultierende Empfindlichkeit des Tumors zur Zeit der Testdosis interessiert, ist dieser wesentliche Versuchseffekt, der quantifiziert werden soll.

Die Abbildung 15 zeigt die Dosiseffektkurven der Wachstumsdauer bis zum Endpoint 300 mg. Die linke Graphik gibt hierbei die unkorrigierten Werte (Wachstumsdauer von der 1. Behandlung an), die rechte die korrigierten Meßwerte (Wachstumsdauer von der Testdosis an) wieder.

Der prinzipielle Kurvenverlauf ist in beiden Graphiken zunächst gleich. Die Kurven mit Vorbehandlung mit 6×7 Gy sind deutlich von der Einzeitkurve nach links abgesetzt. Von diesen wiederum verlagert sind die Kurven für Vorbehandlung mit insgesamt 12×7 Gy. Alle Kurven haben im übrigen den typischen nach oben konkaven Verlauf.

Interpretiert man die Einzeitkurve als Testdosiskurve für Tumoren mit der Vorbehandlung 0, so zeigt sich in der Relation der Kurven, daß aus der Vorbehandlung eine Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit des Tumors resultiert. Sie ist nach 12×7 Gy erwartungsgemäß höher als nach 6×7 Gy.

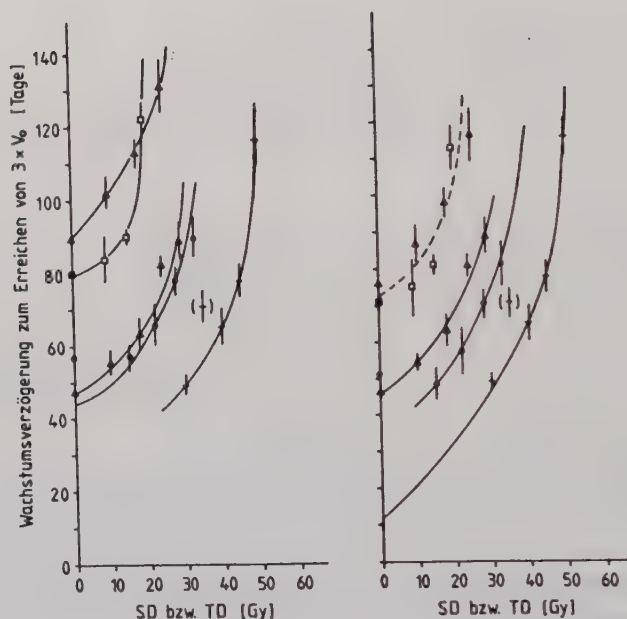


Abb. 15: Unkorrigierte (links) und korrigierte (rechts) Wachstumsverzögerung bis zur dreifachen Tumorausgangsgröße als Funktion der Testdosis bzw. der Einzeldosis. Die Korrektur zieht die Dauer der fraktionierten Behandlung ab, bezeichnet also die Nettoverzögerung von der Testdosis an.

- + Einzeldosis
- $6 \times 7\text{Gy}/7\text{d} + \text{Testdosis}$
- ▲ $6 \times 7\text{Gy}/30\text{h} + \text{Testdosis}$
- △ $6 \times 7\text{Gy}/7\text{d} + 6 \times 7\text{Gy}/7\text{d} + \text{Testdosis}$
- $6 \times 7\text{Gy}/7\text{d} + 6 \times 7\text{Gy}/30\text{h} + \text{Testdosis}$

Der eigentliche Vergleich zielt jedoch auf den Einfluß der Behandlungszeit auf die fraktionierte Bestrahlung und soll einen eventuellen Unterschied zwischen täglicher und kompakter Fraktionierung deutlich machen. Dieser Unterschied ist in der linken Graphik für die Vorbehandlung mit $6 \times 7 \text{ Gy}/30 \text{ h}$ bzw. $6 \times 7 \text{ Gy}/7 \text{ d}$ geringfügig und zeigt eine etwas höhere Resistenz bei täglicher Fraktionierung an. Bei den Kurven mit Vorbestrahlung durch $12 \times 7 \text{ Gy}$ erscheint hingegen, einen Dosispunkt ausgenommen, die konventionelle Fraktionierung ($12 \times 7 \text{ Gy}/14 \text{ d}$) wirkungsvoller.

Diese Darstellung ist jedoch bei näherer Betrachtung nicht geeignet, einen aus der Vorbehandlung resultierenden Empfindlichkeitsunterschied in vollem Umfang zu erfassen. Nimmt man zum Beispiel an, daß durch $6 \times 7 \text{ Gy}/30 \text{ h}$ und $6 \times 7 \text{ Gy}/7 \text{ d}$ die gleiche Vorschädigung erreicht wird, müßte dies bei gleicher Testdosis zu gleichem Effekt (Wachstumsdauer von der Testdosis an) führen. Die zeitlich längere Vorbehandlung wird jedoch zur Gesamtwachstumsdauer addiert, sodaß der Effekt der Testdosis überschätzt, die Resistenz also unterschätzt wird.

Bei konsequenter Betrachtung kann folglich die aus der Vorbehandlung resultierende Empfindlichkeit nur dadurch deutlich gemacht werden, daß die Netto-Wachstumsdauer (Wachstumszeit von der Testdosis an) verglichen wird.

In der rechten Graphik sind alle Meßwerte der Wachstumsdauer auf diesen Zeitpunkt hin korrigiert. Als Folge der Korrektur ist die Dosiseffektkurve für $6 \times 7 \text{ Gy}/7 \text{ d}$ nunmehr um 7 Tage, die Kurve für $6 \times 7 \text{ Gy}/30 \text{ h}$ um 1,5 Tage nach unten verlegt. Dadurch erscheint nun in der Horizontalebene ein Testdosisinkrement, das im unteren Effektbereich 10 Gy, im oberen etwa 6 Gy, im Durchschnitt der vergleichbaren Kurvenabschnitte ca. 7 Gy beträgt.

Dieses Inkrement kann nach dem oben Gesagten als "repopulierte Dosis" interpretiert werden, also als die zur Kompensation der bei täglicher Bestrahlung zusätzlich in der 1. Behandlungswoche nötige Dosis, um den gleichen Effekt zu erzielen.

Dieselbe Korrektur bedeutet für die Kurven der 2. Behandlungswoche eine Vertikalverschiebung nach unten um 14 Tage ($6 \times 7 \text{ Gy}/7 \text{ d} + 6 \times 7 \text{ Gy}/7 \text{ d}$) bzw. 8,5 Tage ($6 \times 7 \text{ Gy}/7 \text{ d} + 6 \times 7 \text{ Gy}/30 \text{ h}$). Die Relativverschiebung zwischen diesen Kurven macht also ebenfalls 5,5 Tage, d.h. den Unterschied in der Vorbehandlungszeit aus. Trotzdem zeigt über den getesteten Dosisbereich die Kurve mit täglicher Bestrahlung in der 2. Woche meist eine etwas längere Wachstumsdauer. Lediglich mit dem höchsten Testdosispunkt wird ein geringerer Effekt als mit den auf einige Stunden verkürzten Fraktionierungsintervallen dargestellt. Die Kurven überschneiden sich folglich. Insgesamt kann in Anbetracht der Streuungen in den einzelnen Meßwerten kein eindeutiger Unterschied zwischen diesen beiden Protokollen festgestellt werden.

Die Schlußfolgerung aus diesem Versuch muß daher sein, daß in der ersten Behandlungswoche die kompakte Fraktionierung wirksamer ist bzw. daß die tägliche Fraktionierung zu einer erhöhten Tumorresistenz führt. Für die zweite Behandlungswoche ist dieser Unterschied nicht feststellbar.

4. DISKUSSION

4.1. Biologische Grundlagen der fraktionierten Bestrahlung

Bald nach Beginn der therapeutischen Nutzung von ionisierender Strahlung wurde deutlich, daß durch Aufteilung und Protrahierung der Dosis eine Änderung der geweblichen Strahlenempfindlichkeit erreicht werden kann. Fast gleichzeitig begannen Versuche, die Bestrahlungsschemata zu optimieren und so eine höhere Effizienz und Selektivität bei der Therapie maligner Tumoren zu erreichen. Die eigentliche biologische Basis wurde jedoch nur schrittweise geschaffen. Einen Meilenstein markierten die Arbeiten von Puck und Markus (33), die aufzeigten, daß die biologische Grundlage der Strahlenwirkung in der Zerstörung der reproduktiven Integrität der einzelnen Zelle liegt. Damit war die Basis für die quantitative Untersuchung der entscheidenden Strahlenwirkung auf die Zelle bzw. der modifizierenden Wirkung einer Dosisfraktionierung geschaffen.

Die Empfindlichkeitsänderung der Zelle unter fraktionierter Bestrahlung faßte Withers 1975 (49) in die auch heute noch weitgehend gültigen "4 R's" der Strahlentherapie. Unter den "4 R's" versteht man die Reparatur vom subletalen Strahlenschaden, die Redistribution, die Reoxygenierung und schließlich die Repopulierung oder Regeneration, die Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

Die Reparatur vom subletalen Strahlenschaden, auch als intrazelluläre oder Elkind-Erholung bezeichnet (11), führt die Überlebenden Zellen im Fraktionsintervall zu ihrer Ausgangsempfindlichkeit zurück. Nach Bestrahlung in vivo ist der gleiche Vorgang anzunehmen, jedoch aus methodi-

schen Gründen nicht direkt ablesbar. Die aus Fraktionierungsversuchen rekonstruierten Dosiswirkungskurven für Tumoren und Normalgewebe folgen meist einer linear-quadratischen Beziehung (1, 10, 12). Der Anfangsteil wird überwiegend von primär letalen Treffern bestimmt. Bei steigenden Dosen tritt zunehmend ein weiterer Mechanismus in Erscheinung, der in der Interaktion von subletalen Strahlenschäden besteht. Unter Erholung versteht man nun die Fähigkeit von Zellen, subletale Strahlenschäden vor ihrer Interaktion mit subletalen Strahlenschäden aus einer nachfolgenden Bestrahlung durch enzymatische Vorgänge im bestrahlungsfreien Intervall zu reparieren. Diese Erholungsvorgänge sind in vivo nach klinisch relevanten Strahledosen innerhalb von 3-6 Stunden, bei Tumoren bereits früher, praktisch abgeschlossen. Bei den im Repopulierungsversuch gewählten Intervallen von mindestens 4 Stunden kann also von vollständiger Erholung ausgegangen werden.

Der zeitliche Abstand zwischen aufeinanderfolgenden Strahledosen kann für die Strahlenempfindlichkeit einer Zellpopulation auch noch in anderer Hinsicht bedeutsam sein. Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus weisen unterschiedliche Strahlensensibilität auf. Zellen in der G_2 - und M-Phase sind vergleichsweise strahlensensibel, während Zellen in der späten S- und in der frühen G_1 -Phase relativ resistent sind (51). Unmittelbar nach der Strahlenbehandlung überleben zunächst mehr Zellen in resistenten Phasen des Zellzyklus. Diese partielle Synchronisation wird aber im Laufe des bestrahlungsfreien Intervalles wieder aufgehoben. Diese Rückverteilung (Redistribution), die an Proliferation gebunden ist, stellt also die ursprüngliche asynchrone Altersverteilung und damit die ursprüngliche Strahlenempfindlichkeit überlebender Zellen wieder her.

Anders als im Normalgewebe gibt es in Tumoren auf Grund von insuffizienter Vaskularisation Zellen, die unter einer niedrigeren als der venösen Sauerstoffspannung stehen (40 mmHg). Bei Unterschreitung eines Sauerstoffpartialdrucks von 10-20 mmHg sind diese hypoxischen Zellen sehr strahlenresistent und machen bei Einzeitbestrahlung intolerabel hohe Dosen erforderlich. Tierexperimente haben gezeigt, daß es bei Fraktionierung im bestrahlungsfreien Intervall zu einer Verbesserung der Sauerstoffspannung kommt und primär hypoxische Zellen auf ein euoxisches Niveau angehoben werden (22). Durch diesen Effekt kann bei fraktionierter Bestrahlung ein Teil der Dosis eingespart werden. Der Mechanismus der Reoxygenierung wirkt damit ebenso wie die Redistribution dem schützenden Effekt der Erholung wie auch dem resistenzsteigernden Effekt der Repopulierung entgegen. In den eigenen Untersuchungen wurde der Einfluß der Reoxygenierung dadurch ausgeklammert, daß die Blutversorgung der Tumoren vor und während der Bestrahlung unterbrochen wurde und damit alle Zellen gleichmäßig in einen weitgehend anoxischen Zustand überführt wurden.

Während die drei oben genannten Faktoren die zelluläre Strahlenempfindlichkeit modifizieren, handelt es sich bei der Repopulierung um eine numerische Zunahme von Zielzellen in den Bestrahlungspausen. Normalgewebe reagieren auf die durch Bestrahlung bedingte Depopulierung mit einer verzögerten homöostatischen Reaktion, die in einer Zunahme der Regenerationsleistung und damit in einer Steigerung der Zellproduktionsrate besteht (14). Ein besonders deutliches Beispiel für diesen Mechanismus bieten die sog. Erneuerungsgewebe, wie z.B. die orale und gastrointestinale Mukosa oder die Epidermis. Stimulierte Proliferation wird in diesen Geweben dann beobachtet, wenn auf Grund der Umsatzzeit der differenzierten (strahlenresistenten) Zellen

der fehlende Zellnachschub aus dem (strahlensensiblen) Stammzellkompartement manifest wird. Die Regenerationsleistung geht somit von den gewebsspezifischen Stammzellen aus. Grundsätzlich besitzen auch spät regierende Gewebe Regenerationsmöglichkeiten, die Repopulierungsfähigkeit hängt jedoch wesentlich von der dem Gewebe eigenen Proliferationsrate ab. So zeigt ein Gewebe wie z.B. das ZNS kaum regenerative Antwort auf Bestrahlung.

Grundsätzlich kann natürlich auch Tumorgewebe auf eine Zelldepletion mit Repopulierung reagieren. Unter Umständen drückt sich darin nur eine verbesserte nutritive Situation aus, also eine Verbesserung des Verhältnisses von zu ernährenden Zellen zu den vorhandenen Kapillaren, doch kann eine homöostatische Reaktion als Reminiszenz an das Muttergewebe nicht ausgeschlossen werden. Bei fraktionierter Bestrahlung ist die Regenerationsleistung abhängig von der Dauer des Fraktionierungsintervalls und damit von der Gesamtbehandlungszeit, aber auch von der (tumorspezifischen) Proliferationsbereitschaft der klonogenen Zellen. Abbildung 16 zeigt schematisiert die Bedeutung der Repopulierung für die Abnahme der Stammzellzahl unter fraktionierter Bestrahlung. Bei langen Intervallen (rechte Kurve) wird Repopulierung möglich, die in diesem Fall vereinfacht als konstant über den Behandlungszeitraum angenommen wird.

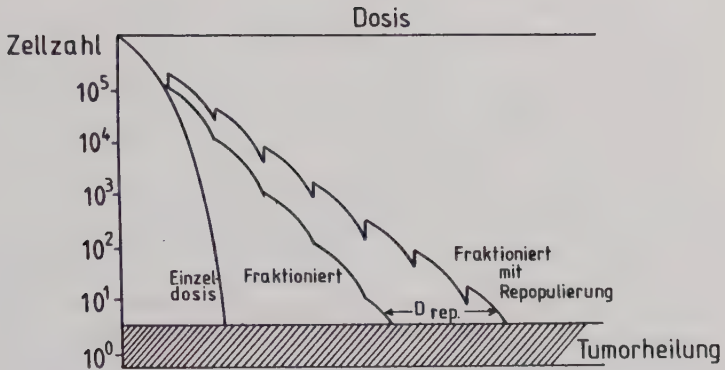


Abb. 16: Schematische Darstellung der Abnahme klonogener Tumorzellen bei zunehmender Gesamtdosis und zwar für

- Einzeithbestrahlung (linke Kurve)
- fraktionierte Bestrahlung ohne Repopulierung (mittlere Kurve)
- fraktionierte Bestrahlung mit Repopulierung in den Fraktionsintervallen (rechte Kurve)

(modifiziert aus 44).

Die resultierende Überlebenskurve wird proportional zu den Zellverdopplungen, die während der längeren Behandlungszeit ablaufen, deutlich flacher. Im allgemeinen kann jedoch nicht die Zellüberlebensrate gemessen werden, sondern lediglich die zusätzliche Dosis, die für die Wahrung einer definierten, mit der Zahl überlebender Zellen eng verknüpften Tumorwirkung notwendig ist. In Abb. 16 ist dies die Tumorheilungswahrscheinlichkeit. Einen weiteren Endpunkt in diesem Sinn, der zumindest experimentell einer Messung gut zugänglich ist, stellt die Tumorwachstumsverzögerung dar.

4.2. Wachstumsverzögerung in situ als Methode zur Darstellung der zellulären Strahlenwirkung

Wie soeben erwähnt, ist die direkte Bestimmung der zellulären Überlebensrate in behandelten Tumoren selbst in der Regel nicht möglich. Sie kann im Experiment auf gewissen technischen Umwegen erfolgen, wobei im Prinzip eine Einzelzellsuspension hergestellt wird und die Überlebensrate der Zellen dann durch Aussaat in vitro (17) oder Überimpfung auf Wirtstiere mittels der sogenannten quantitativen Transplantation (16) oder des sogenannten lung colony assay (15) geprüft wird. Alle diese Ansätze stoßen bei protrahierter Behandlung des Tumors wegen der damit verbundenen regressiven geweblichen Veränderungen jedoch auf Schwierigkeiten. Viele Fragestellungen erfordern indes nicht die genaue Kenntnis der Zellüberlebensrate. Dies gilt vor allem für den Vergleich verschiedener Therapiemodalitäten, beispielsweise für die Gegenüberstellung verschieden fraktionierter Bestrahlung zur Ermittlung der Erholungsfähigkeit (9) oder - wie im vorliegenden Fall - einer gleichartig fraktionierten Bestrahlung mit unterschiedlicher Behandlungszeit zur Untersuchung der Repopulationsleistung. In diesem Fall werden Isoeffektivdosen verglichen und zellulär interpretiert. Dabei wird die begründete Annahme gemacht, daß bei Verwendung einer konstanten Tumorwirkung (z.B. 50%-Heilungsrate) eine definierte, wenn auch unbekannte Zahl überlebender Zellen zugeordnet werden kann (40).

Als Untersuchungsmethode zur Dokumentation einer solchen Tumorwirkung hat sich in der Strahlenbiologie neben der Heilungswahrscheinlichkeit (lokale Rezidivfreiheit) vor allem die Wachstumsverzögerung (=regrowth delay assay) etabliert (42), die auch in der Analyse klinischer Daten zum Teil anwendbar ist (27, 32, 52). Als Dosisseffekt wird dabei die therapieinduzierte Wachstumsverzögerung betrachtet. Sie ist definiert als die Differenz der Wachstumszeit

von behandelten und unbehandelten Tumoren, die zum Erreichen einer bestimmten Tumor- bzw. Rezidivgröße benötigt wird. Die Methode basiert auf der fortlaufenden Registrierung des Tumolvolumens post radiationem. Die Vorteile des Verfahrens beruhen darauf, daß es bei breiter Anwendbarkeit einfach und leicht reproduzierbar ist und einen großen verwertbaren Dosisbereich erschließt.

Grundlagen und Problematik des regrowth delay assay sollen unter Bezugnahme auf schematisierte Einzeldosiskurven der Abbildung 17 (vergleiche Abb. 5 und 8) dargestellt werden.

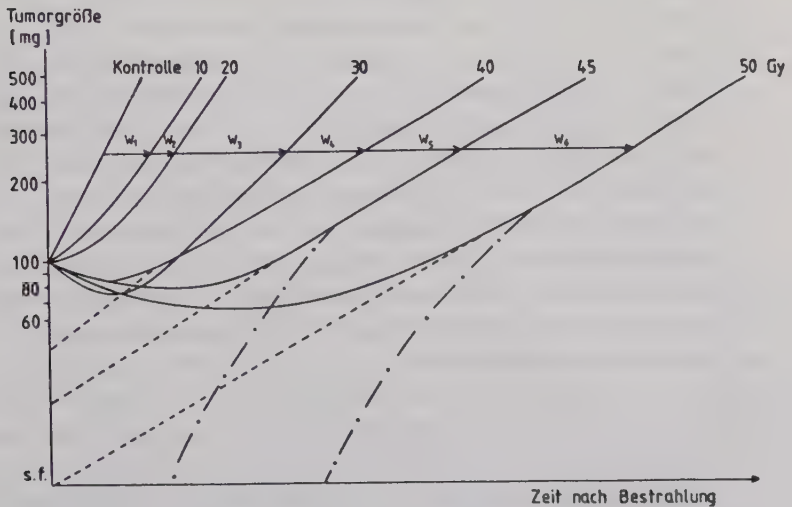


Abb. 17: Schematisierte Einzeldosiskurven, abgeleitet aus den Abb. 5 und 8, zur Darstellung der Wachstumsverzögerung. Dosisangaben an den Kurven. Die direkte Rückextrapolation aus den Rezidivwachstumskurven führt aufgrund der Wachstumsretardierung im klinischen Größenbereich zu einer Überschätzung der Überlebensrate. Die tentative Rückextrapolation auf die tatsächliche zelluläre Überlebensrate nach Bestrahlung wird durch die punktgestrichelten Linien nach den beiden höchsten Dosen dargestellt.

Wie früher schon beschrieben, zeigt das Tumorsystem AT 55 nach subkurativen Einzeldosen im niedrigen Dosisbereich keine makroskopische Schrumpfung und auch nach höheren Dosen keine ausgesprochen dosisabhängige Regression. Die initialen Volumenschwankungen werden zwar als Maß der geweblichen Strahlenreaktion herangezogen, können jedoch das Ausmaß der Stammzelleninaktivierung und damit die zelluläre Strahlenreaktion des Tumors nicht adäquat wieder spiegeln (2, 21). Wie auch aus der Histologie hervorgeht (vergleiche 3.1.3.), wird unmittelbar post radiationem im Tumor AT 55 kein eindeutiger Schaden manifest. Erst einige Wochen nach Bestrahlung treten histologisch Nekroseherde und eine Umorganisation des Tumorgewebes in Erscheinung, der sich dann bereits Regenerationsvorgänge überlagern. Das Ausmaß der Tumorregression ist also eher abhängig von der Geschwindigkeit der Abräumung und Lyse abgestorbenen Materials und nicht von der Zahl überlebender Stammzellen. Für ein Rhabdomyosarkom der Ratte wurde beispielsweise keine Schrumpfung nach Dosen registriert, die eine Zellüberlebensrate von ca. 5 % bedingten (21). Ähnlich groß ist die beobachtete Diskrepanz in einem Adenokarzinom der Maus (ebenfalls C3H-Kolonie Neuherberg), bei dem eine Quantifizierung der Überlebensrate durch Messung der Koloniebildung in situ möglich ist.

Ebenso ist aus der Rückextrapolation der Rezidivwachstumskurve eine verlässliche Abschätzung der zellulären Überlebensrate nicht möglich, wofür zwei Gründe verantwortlich sind (4). Dies ist einmal das Residualvolumen des bestrahlten Tumors, das bei mäßiger Schrumpfung größtenteils von inaktivierten Zellen, Narbengewebe, etc. bestimmt wird. Durch Einbeziehung dieses toten Volumens wird die Wachstumsgeschwindigkeit am Beginn des progressiven Rezidivwachstums verkleinert. Bei Betrachtung der Abbildung 17 wird zudem ersichtlich, daß die Wachstumsrate behandelter Tumoren bleibend geringer als die der unbehandelten Kon-

trollgruppe ist. Diese Wachstumsretardierung, auch als "Tumorbetteffekt" bezeichnet, beruht nicht auf einer Schädigung der überlebenden Tumorzellen, sondern auf der Schädigung des versorgenden Gefäßbindegewebes (4). Das histologische Korrelat liegt in einer Zunahme der Nekroseneigung bzw. in einer Erhöhung des Zellverlusts des Tumorparenchyms (18, 19, 31). Aus einer Reihe tierexperimenteller Untersuchungen geht hervor, daß der Tumorbetteffekt unterschiedlich fraktionierungs- und dosisabhängig ist und häufig erst dann einsetzt, wenn das Rezidiv näherungsweise die Ausgangstumorgroße erreicht (18, 19, 43).

Aus dem Problem des Residualvolumens ergibt sich, daß der Endpunkt zur Analyse der Wachstumsverzögerung ausreichend hoch zu wählen ist. Aus dem Tumorbetteffekt dagegen folgt, daß die Wachstumsverzögerung möglichst auf einem niedrigen Endpunkt abgegriffen werden sollte. Diese Gesichtspunkte verlieren aber an kritischer Bedeutung, wenn für die zu vergleichenden Behandlungsmodalitäten die Dosisabhängigkeit der Regression und des Tumorbetteffektes nicht verschieden ist. Die Abbildungen 11 und 14 zeigen beispielhaft, daß bei annähernd gleicher Wachstumsverzögerung auch die Steigungen der Rezidivwachstumskurven im Mittel vergleichbar sind. Der Repopulierungsversuch wurde aus diesen Gründen bei einem Effektlevel von T 300 ausgewertet (siehe Abbildung 15).

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß die Wachstumsverzögerung kein Maß für die absolute Überlebensrate der Zellen in vivo ist. Sie liefert jedoch gut definierte Dosiseffektkurven, die die zelluläre Strahlenwirkung mitbeinhalten und für den Wirkungsvergleich verschiedener Behandlungsschemata ausgezeichnet geeignet sind (5). Als zugrundeliegendes Prinzip gilt, daß einer definierten Wachstumsverzögerung jeweils eine bestimmte Anzahl überlebender Zellen zugeordnet werden kann.

4.3. Repopulierungsleistung des Tumors AT 55

4.3.1. Versuchsdesign

Das Versuchsdesign ist auf eine Untersuchung der Repopulierung in zwei aufeinanderfolgenden Behandlungswochen hin angelegt. Der Behandlungserfolg unter konventioneller klinischer Bestrahlung mit 6 Fraktionen innerhalb von 7 Tagen wird dem eines Vergleichsarmes gegenübergestellt, in dem die gleichen 6 Strahlenfraktionen innerhalb von 1,5 Tagen verabreicht werden. Da auch in diesem konzentrierten Arm volle Erholung zwischen den Strahlendosen möglich ist, beruht ein eventuell meßbarer Empfindlichkeitsunterschied auf der im konventionellen Arm ablaufenden Repopulierung. Sämtliche Protokolle wurden mit graduierten Test- oder Top-up-Dosen abgeschlossen, die diesen Empfindlichkeitsunterschied sichtbar machen. Sie haben zudem den Effekt, daß die Tumorstärke auch bei geringer Wirkung der fraktionierten Behandlung in einen meßbaren Bereich gehoben wird. Aus der Differenz isoeffektiver Testdosen kann damit letztlich auf den Unterschied in der Wirksamkeit der Vorbehandlung geschlossen und diese als "repopulierte Dosis" ausgedrückt werden. Zusätzliche Einzeitbestrahlungen sollen den Fraktionierungseffekt darstellen.

Das vollständige Versuchsdesign umfaßt somit folgende Arme:

- | | |
|-------------------------------|---------------|
| - Einzeldosen (SD) | |
| - 6F/1,5d + Testdosis | } Testwoche 1 |
| - 6F/7d + Testdosis | |
| - 6F/7d + 6F/1,5d + Testdosis | } Testwoche 2 |
| - 6F/7d + 6F/7d + Testdosis | |

4.3.2. Versuchsergebnisse

Die Repopulierungsleistung des Tumors AT 55 wurde nach den oben aufgeführten Protokollen ermittelt. Die experimentellen Ergebnisse sind in den Dosiseffektkurven der Abbildung 15 (rechtes Teilbild) dargestellt. Die Wachstumsverzögerung nach der Top-up-Dosis ist hier als Funktion der Top-up-Dosis aufgetragen. Die Gesamtwirkung der fraktionierten Bestrahlung kommt somit in der Linksverschiebung der einzelnen Dosiswirkungskurven zu niedrigeren Testdosen hin zum Ausdruck.

Der Vergleich der Dosiseffektkurven für 6F/1,5d und 6F/7d zeigt an, daß die konzentrierte Bestrahlung in der ersten Behandlungswoche zu einer höheren Empfindlichkeit des Tumors gegenüber der Testbestrahlung führt. Das entsprechende Testdosisinkrement beträgt bei einem Verzögerungsniveau von beispielsweise 65 Tagen 7 Gy. Auch auf anderen Verzögerungsniveaus ändert sich die Höhe der repopulierten Dosis in der ersten Woche nicht entscheidend. Bei Tumoren, die in der ersten Woche mit 6F/7d bestrahlt wurden und in der zweiten Woche 6F/1,5d bzw. 6F/7d erhielten, ist kein signifikanter Unterschied darstellbar. Hieraus ist zu folgern, daß eine nennenswerte Repopulierung im Tumor AT 55 im wesentlichen in der ersten Behandlungswoche abläuft. Die Zahl der involvierten Zellverdopplungen kann nicht ohne weiteres angegeben werden. Es ist jedoch möglich aus dem "repopulierten Testdosisinkrement" von 7 Gy rechnerisch eine Zahl äquivalenter Dosisfraktionen (also die Zahl durch Repopulierung kompensierter Dosisfraktionen) abzuschätzen. Dies setzt zunächst eine formelle Behandlung des reinen Fraktionierungseffektes voraus.

Betrachtet man die Behandlungsprotokolle, so lassen sich Kurvenpaare selektieren, die aufgrund der Gesamt-

behandlungszeit vermutlich gleiche Repopulierung, aber unterschiedliche Fraktionierung beinhalten. Dies sind SD und 6F/1,5d (beide ohne Repopulierung), sowie 6F/7d und 12F/8,5d (beide mit gleicher Repopulierung in der ersten Woche). Nach der sog. linear-quadratischen Dosiswirkungsbeziehung, deren Gültigkeit für in vivo Strahleneffekte an Tumoren und Normalgeweben hinreichend erwiesen ist (12, 20, 47), müssen sich Dosis-effektkurven mit gleicher Repopulierung, jedoch unterschiedlicher Fraktionierung ineinander überführen lassen. Das linear-quadratische Modell impliziert für locker ionisierende Strahlen die sog. "duale Strahlenwirkung", wonach die Energiedeposition sowohl primär letale Schäden verursacht als auch subletale Läsionen, die erst durch Interaktion letal werden. Primär letale Ereignisse steigen linear mit der Dosis, während die Interaktion von zwei subletalen Treffern dem Dosisquadrat proportional ist. Die resultierende Dosiswirkungskurve, zunächst als zelluläre Überlebenskurve interpretiert, setzt sich somit aus einem linearen und einem quadratischen Anteil zusammen. Als Gleichung resultiert für die Überlebensrate (sf):

$$sf = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}; \quad (1) *$$

$$\text{bzw. } -\ln sf = \alpha D + \beta D^2; \quad (2)$$

Für fraktionierte Bestrahlung mit konstanten Fraktionen wird angenommen, daß jede Fraktion den gleichen Wirkungsbeitrag leistet. Somit gilt:

$$-\ln sf = n(\alpha d + \beta d^2); \quad (3)$$

* D = Gesamtdosis, sf = Überlebensrate, d = Dosis pro Fraktion, α = Konstante für direkt letale Strahlenwirkung, n = Zahl der Fraktionen, β = Konstante für interaktive Strahlenwirkung

Die tatsächliche Größe der zellulären Überlebensrate ist dabei für die meisten Gewebseffekte unbekannt. Sie kann aber durch den proportionalen Effekt E ersetzt werden, da anzunehmen ist, daß einem definierten Effekt (Wachstumsverzögerung) immer eine bestimmte Überlebensrate entspricht, gleich durch welchen Bestrahlungsmodus der definierte Gewebseffekt erreicht wurde. Falls der Effekt E durch Fraktionierung plus eine zusätzliche Top-up-Dosis (TD) erreicht wird, gilt somit:

$$E = n(\alpha d + \beta d^2) + \alpha TD + \beta (TD)^2 \quad (4)$$

Durch Gleichsetzen der Einzeldosiskurve für beliebige Effekt-Levels mit der fraktionierten Gleichung (mit Top-up) können die Parameter bestimmt werden, mit denen sich die fraktionierte Bestrahlung in eine äquieffektive Einzeitbestrahlung überführen läßt:

$$\alpha (SD) + \beta (SD)^2 = n(\alpha d + \beta d^2) + \alpha (TD) + \beta (TD)^2$$

bzw.

$$\alpha/\beta (SD) + (SD)^2 = n(\alpha/\beta d + d^2) + \alpha/\beta (TD) + (TD)^2;$$

Durch Variieren des Parameters α/β kann der beste Fit für die experimentellen Werte ermittelt werden. Dies wurde mit einem im Insitut vorhandenen Programm berechnet und ergab einen Wert von $\alpha/\beta = 40$ Gy. Der gleiche Wert beschreibt auch die Beziehung zwischen den Dosispunkten für $6F/7d + TD$ und $6F/7d + 6F/1,5d + TD$ am besten.

In Abbildung 18 sind die berechneten Kurven durch gestrichelte Linien dargestellt.

Mit Hilfe des Fraktionierungsparameters α/β kann man ein repopuliertes Testdosisinkrement in eine äquiva-

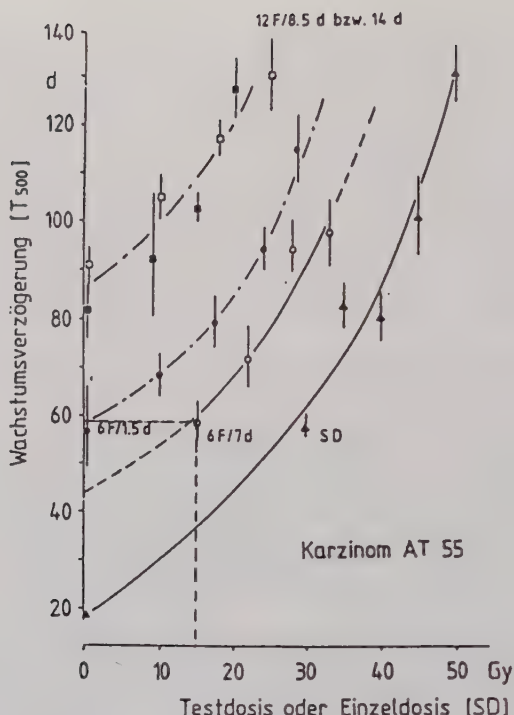


Abb. 18: Dosis-effekt-Kurven der Wachstumsverzögerung für den Tumor AT 55. Angabe des Fraktionierungsschemas an den Kurven (siehe auch Abb. 15). Die Punkt-Strich-Kurven für die akzelerierten Schemata wurden für ein α/β von 40 Gy berechnet (Erläuterungen siehe Text).

lente Zahl repopulierter Fraktionen umrechnen. Das Testdosisinkrement kann prinzipiell auf jedem Verzögerungsniveau abgegriffen werden. Als anschaulichstes Beispiel soll hierfür aber ein Verzögerungslevel gewählt werden, der in einem Vergleichsarm die Testdosis 0 Gy bedingt. Für den Vergleich 6F/1,5d versus 6F/7d ist dies die Wachstumsverzögerung 59 d. Dieser Effekt wird bereits durch 6F/30h erreicht, bei Vorfraktionierung mit 6F/7d benötigt man zusätzlich eine Testdosis von 15 Gy. Hierfür gilt aufgrund der Äquivalenz beider Behandlungen:

$$6 (\alpha/\beta \cdot 7\text{Gy} + (7\text{Gy})^2) = (6-x) (\alpha/\beta \cdot 7\text{Gy} + (7\text{Gy})^2) + \alpha/\beta \cdot 15\text{Gy} + (15\text{Gy})^2;$$

wobei x die Zahl der repopulierten Fraktionen beim langen Fraktionierungsschema ist. In der Gleichung wird also links die Wirkung des akzelerierten Schemas mit 6x7 Gy gegenübergestellt der gleichen Wirkung des pro-trahierten Schemas mit 6x7 Gy, wobei die Wirkungsverminderung als eine formale Verminderung der Zahl der effektiven Fraktionen dargestellt ist (6-x), die dann kompensiert wird durch die Addition der Testdosis. Für ein α/β von 40 Gy erhält man nach Auflösung als Zahl repopulierter Fraktionen

$$x = 2,5;$$

Die notwendig werdende Top-up-Dosis von 15 Gy bei konventioneller Bestrahlung tritt also an die Stelle der durch Repopulierung kompensierten Fraktionen. Sie entspricht in ihrer Wirkung 2,5 Fraktionen von 7 Gy. Geht man davon aus, daß 7 Gy (clamp) einer Fraktionsdosis von 2,6 Gy für euoxische Zellen entsprechen (Sauerstoffverstärkungsfaktor 2,7), so läßt sich die Zahl der wirksamen Zellverdopplungen daraus abschätzen, die unter konventioneller Bestrahlung ablaufen. Sie richtet sich nach der mutmaßlichen Wirkung einer Einzeldosis von 2,6 Gy, die nach Untersuchungen an einer Vielzahl von Tumorzelllinien in der Zellkultur einer Überlebensrate von weniger als 0,5 entsprechen dürfte (6, 28). Die Zahl repopulierter Fraktionen kann demnach mit annähernd 3 Zellverdopplungen gleichgesetzt werden. Umgekehrt folgt für die konventionelle Bestrahlung in der ersten Woche eine Repopulierung mit einer effektiven Verdopplungszeit von $7/3 \text{ d} = \text{ca. } 2,4 \text{ Tagen}$. Diese Repopulierungsaktivität gilt allerdings nur für die erste Behandlungswoche. In der zweiten Behandlungswoche überlagern sich beide Kurven, woraus sich ergibt, daß in der zweiten Behandlungswoche keine Repopulierung nachweisbar ist.

4.4. Repopulierungsleistung in verschiedenen Tumoren von Nager und Mensch

4.4.1. Zellproliferation und Wachstum unbehandelter Tumoren

Die Zellproduktionsrate des unbestrahlten Tumors AT 55 kann aus den autoradiographischen Daten (siehe 3.1.4.) abgeschätzt werden. Damit wird ein Vergleich zwischen Zellproduktionsrate und tatsächlicher Wachstumsrate ermöglicht. Zwischen beiden Größen besteht im allgemeinen eine erhebliche Differenz, da ein tumorspezifischer Zellverlust einen Teil der Zellvermehrung kompensiert.

Aus dem Anteil der markierten Zellen an der Gesamtpopulation (= Markierungsindex LI) kann die Zellneubildung berechnet werden (37). Die markierte Kohorte DNA-synthetisierender Zellen benötigt für ihren Durchgang durch die Mitose die Dauer der S-Phase (T_S). Aus diesen Werten läßt sich die potentielle, d.h. die in Abwesenheit von Zellverlust theoretisch notwendige, Verdopplungszeit berechnen:

$$T_{\text{pot}} = \frac{TS \cdot \lambda}{LI};$$

Die Dauer der S-Phase kann bei Mäusetumoren mit 8 Stunden und der Korrekturfaktor λ , der wegen der nicht linearen Altersverteilung der Population einzusetzen ist, mit 0,8 veranschlagt werden (38). So ergibt sich für die Tumorzellpopulation des Karzinoms AT 55 eine potentielle Verdopplungszeit von

$$T_{\text{pot}} = 42,7 \text{ h} = 1,8 \text{ d};$$

Diese potentielle Verdopplungszeit liegt erheblich niedriger als die tatsächliche Volumenverdopplungszeit $T_{100/200}$ der unbestrahlten Kontrollen aus Passage 4, die im Mittel 6,5 Tage (vergleiche Tab. 2) beträgt. Hieraus berechnet sich ein für Karzinome typischer hoher Zellverlustfaktor von 72 % (7, 8).

Die aus den Repopulierungsexperimenten abgeleitete effektive Verdopplungszeit von 2,4 Tagen unter konventioneller Bestrahlung in der ersten Woche ist somit wesentlich kürzer als die Volumen- und damit Zellverdopplungszeit des unbehandelten Tumors. Sie entspricht jedoch in etwa der potentiellen Verdopplungszeit des Tumors. Es bestätigt sich zumindest für die erste Behandlungswoche die Hypothese, daß die unter konventioneller Fraktionierung mögliche Repopulierungsrate mit der Proliferationsleistung der ungestörten Tumorzellen annähernd übereinstimmt (41, 44).

Tabelle 7 gibt einen Vergleich potentieller Verdopplungszeiten von unbehandelten Adenokarzinomen der Mamma wieder, die beim Menschen durch Autoradiographie von in vitro markierten Gewebeproben gewonnen wurden (29, 44).

Tumor	LI (%)	T_{pot} (Tage)
Mammakarzinom AT 55 (Maus)	15	1,8
Mammakarzinom (Mensch)		
Kernatypie: - gering	1,2	50
- mittel	3,5	17
- schwer	8	8

Tab. 7: Potentielle Verdopplungszeiten von Adenokarzinomen der Mamma (29, 44).

Wie aus der Tabelle hervorgeht, liegt die potentielle Verdopplungszeit von Mammatumoren des Menschen im Mittel weit über dem Wert des Mäusetumors AT 55, vor allem wenn man berücksichtigt, daß das Häufigkeitsmaximum des LI eher bei 3,5 % liegt (29). Mammakarzinome des Menschen könnten demnach zu den weniger repopulierungsaktiven Tumoren gehören (44).

4.4.2. Ausmaß und Zeitverlauf der Repopulierung

Auch über die Kinetik der Repopulierung in Experimentaltumoren gibt es nur wenige Mitteilungen. Mit der beschriebenen Versuchstechnik wurden in letzter Zeit in der eigenen Arbeitsgruppe entsprechende Daten an transplantablen Tumoren erhoben, die in Tabelle 8 zusammengestellt sind (35). Angegeben ist die wöchentliche Repopulierungsleistung in Form der Zahl 'repopulierter Fraktionen' während konventioneller Bestrahlung über 2 Wochen.

Tumor	α/β	d/F	Repopulierte Fraktionen	
	(Gy)	(Gy)	Woche 1	Woche 2
Adenokarzinom AT 55	40	7	2,5	0
Adenokarzinom AT 17	30	7	1,9	0
Mammakarzinom AT 7	66	4	0,7	3,4
Fibrosarkom SSK 2	35	8	4,8	3,2
Plattenepith.Ca.AT478	45	7	2,1	4,0

Tab. 8: Repopulierungsleistung transplantabler Mäusetumoren unter täglich fraktionierter Bestrahlung (6F/7d), ausgedrückt als "repopulierte Fraktionen".
Modifiziert aus (25).

Das Adenokarzinom AT 17 zeigt ein sehr ähnliches Repopulierungsverhalten wie der Tumor AT 55, d.h. erhebliche Regeneration in der 1. Woche, jedoch keine nennenswerte Repopulierung in der 2. Woche. Bei zwei der drei weiteren Tumoren steigt im Gegensatz dazu die Repopulierungsleistung in der 2. Woche an. Tabelle 8 wie auch weitere Literatur belegen, daß die Regenerationsleistung experimenteller Tiertumoren im Laufe mehrwöchiger Bestrahlung erheblichen Schwankungen unterworfen ist. Ein Rhabdomyosarkom der Ratte wurde über 3 und mehr Wochen mit 300 kV Röntgenstrahlen behandelt (5 Fraktionen pro Woche; Dosis pro Fraktion 2,3 und 4 Gy) (2). Die Effektivität der Behandlung zeigte dabei in der 3. Woche (3 Gy/Fraktion) bzw. in der 3. und 4. Woche (2 Gy/Fraktion) eine vorübergehende Abnahme, stieg jedoch ab der 5. Woche wieder an. Die Zunahme klonogener Zellen scheint also auch in diesem Fall auf einen bestimmten Behandlungsabschnitt beschränkt. Diese Schlußfolgerungen sind jedoch mit erheblicher Unsicherheit belastet, weil die Bestrahlung unter ambienten (nicht hypoxischen) Bedingungen erfolgte und die Resistenzschwankungen daher nicht sicher als Repopulierung interpretierbar sind. Suit et al. (39) maßen die Repopulierungsleistung eines Mammakarzinoms der C3H-Maus in einer ausgedehnten Fraktionierungsstudie, die auch clamp-Bestrahlung mit 2 bis 20 Fraktionen bei unterschiedlichen Intervallen enthält. Für 20F/9d bzw. 20F/18d betrug die mittlere Heilungsdosis 150 Gy bzw. 204 Gy; die Autoren berechnen daraus, daß sich jeweils 60 % der Überlebenden Zellen im Fraktionsintervall bei täglicher Bestrahlung teilen. Ein Anstieg der mittleren Heilungsdosis wurde jedoch nicht beobachtet, wenn 10 Fraktionen als 3F/d, 2F/d oder 1F/d eingestrahlt wurden. Ebenso wurde bei Behandlung mit 2 Fraktionen kein Anstieg der Heilungsdosis bei einem Intervall von 3 d

beobachtet. Diese Ergebnisse lassen sich dahin weitgehend interpretieren, daß die Repopulierungsleistung nicht nur von der bestrahlungsfreien Zeit, sondern auch von der verwendeten Dosis pro Fraktion abhängig ist.

Zur Repopulierung experimenteller Tumoren läßt sich zusammenfassend sagen, daß die Repopulierungsaktivität der verschiedenen Tumoren unterschiedlich und offenbar bei gleichbleibender Bestrahlung im Verlauf mehrerer Wochen nicht konstant ist. Die weitere Analyse und vor allem die Frage nach den biologischen Ursachen wird ein wichtiges Anliegen der experimentellen Strahlentherapie sein.

Die Analyse klinischer Daten erfolgt letztlich ebenfalls über die Abhängigkeit der Tumoresistenz von der Behandlungszeit. Ein markantes Beispiel sind die Daten über das schnell wachsende Burkitt-Lymphom (30). Sie zeigen, daß die Behandlungserfolge nach Bestrahlung mit kurzen Intervallen (3 Fraktionen/Tag) signifikant besser sind als die nach konventioneller Fraktionierung. Weitergehende quantitative Schlußfolgerungen wurden von Maciejewski et. al. (26) aus einer Analyse der Heilungsergebnisse von fortgeschrittenen Larynxkarzinomen ($T_{3,4}N_{0M_0}$) gezogen. Die lokale Rezidivfreiheit sank bei einer Zunahme der Gesamtbehandlungszeit von 32 auf 46 Tage von 80 % auf 25 % ab, auch wenn die unterschiedliche Zeit nach der Ellis-Formel berücksichtigt wurde. Umgekehrt betrug die zusätzliche Dosis zur Wahrung einer 50 %igen lokalen Heilungsrate für die gleiche Behandlungszeitverlängerung im Mittel 8 Gy (4×2 Gy). Hieraus leitet sich für den genannten Behandlungszeitraum eine hohe Repopulierungsrate mit einer effektiven Verdopplungszeit der Zellen von 4-5 Tagen ab. Eine umfassende Analyse von Withers et al. (50) an über

40 Bestrahlungsserien, die alle Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches betreffen, kommt zu dem Ergebnis, daß im Mittel die Repopulierung erst bei einer Überschreitung der Behandlungszeit von 30 Tagen einsetzt und dann mit einer Rate verläuft, die 0,6 Gy/d kompensiert.

Auch für die Klinik gelten daher die Schlußfolgerungen, daß unterschiedliche Tumortypen wahrscheinlich sehr unterschiedlich repopulieren und daß die Repopulierungsrate über die gesamte Behandlungsperiode nicht konstant ist. Daraus ergibt sich, daß es auf Grund der bisherigen Ergebnisse nicht möglich ist, die Behandlungszeit mit generalisierten Isoeffektformeln in der Klinik zu berücksichtigen.

Für schnell repopulierende Tumoren (Plattenepithelkarzinome) wird bereits heute eine Verkürzung der Behandlungszeit angestrebt, wie sie durch mehrmals tägliche Bestrahlung erreicht wird. Dabei treten unvermeidbar Komplikationen von seiten der akut reagierenden Normalgewebe auf. So limitiert heute die schwere Mukositis der Mundschleimhaut die konsequente Durchführung einer akzelerierten Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich (36).

Die Optimierung der Strahlentherapie erfordert daher weitere Detailkenntnisse über die Repopulierungsneigung und -kinetik verschiedener Tumortypen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

An einem isogenen Mammakarzinom der C3H-Maus (Karzinom AT 55) wurden Transplantabilität, Wachstumsverhalten und vor allem Repopulierungsleistung unter fraktionierter Bestrahlung untersucht.

Histologisch handelt es sich bei diesem Tumor um ein Adenokarzinom der Mamma mit soliden Anteilen. Bei Passagierung zeigte der Tumor histologisch keine Rückdifferenzierung, jedoch eine Beschleunigung des Wachstums, das sich in einer Abnahme der Verdopplungszeit von 9,2 auf 4,4 Tage ausdrücken läßt. Auf fraktionierte und Einzeitbestrahlung reagiert der Tumor auch nach höheren Dosen mit nur mäßiger Regression, jedoch mit einer dosisabhängigen Wachstumsverzögerung. Damit ist es möglich, die Wirkung verschiedener Bestrahlungsprotokolle quantitativ zu vergleichen.

Der Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Repopulierung. Es wurde versucht, sie in einer 1. und 2. Behandlungswoche durch Gegenüberstellung von konzentrierter und konventioneller Bestrahlung (6 Fraktionen/7 Tage) zu quantifizieren. Die Zahl der Fraktionen und die Dosis pro Fraktion (7 Gy unter Hypoxie, entspricht ca. 2,5 Gy unter dem normalen Sauerstoffdruck im Gewebe) war in beiden Vergleichsarmen identisch, und sämtliche Protokolle wurden mit graduierten Aufsättigungsdosen abgeschlossen. Die Effizienz und somit das Ausmaß der Repopulierung der unterschiedlichen Vorbehandlung konnte daher durch die Differenz isoeffektiver Testdosen ausgedrückt werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Tumor AT 55 in der 1. Woche ein Testdosisäquivalent von 7 Gy repopulierte, während in der 2. Behandlungswoche keine Repopulierung mehr nachzuweisen war. Für Bestrahlungsprotokolle, die sich nur in

ihrer Fraktionierung, nicht aber in ihrer Repopulierung unterscheiden, stimmen die Wachstumsverzögerungsdaten gut mit einer linear-quadratischen Dosiswirkungsbeziehung und einem α/β -Wert von 40 Gy überein. Dies ermöglicht, den Testdosisunterschied in Form von äquivalenten Dosisfraktionen auszudrücken, die unter täglicher Bestrahlung repopuliert werden. Im vorliegenden Fall sind dies in der ersten Woche 2,5 Fraktionen, die wahrscheinlich 3 Zellverdopplungen entsprechen. In der zweiten Woche tritt keine Repopulierung auf. Im Vergleich zu anderen Transplantattumoren ist dies eine eher geringe Repopulierungsleistung.

Auch das Mammarkarzinom beim Menschen gehört nach den bisherigen Untersuchungen zu den Tumortypen, die wahrscheinlich in ihrer Mehrheit eine eher geringe Repopulierungsneigung aufweisen. Es steht damit im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom, bei dem nach neueren klinischen Analysen ein erheblicher Teil der Tumoresistenz bei konventioneller Strahlentherapie durch Repopulierung bedingt wird.

6. LITERATUR

1. BARENDSEN, G.W.: Dose fractionation, dose-rate and iso-effect relationships for normal tissue responses. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8 (1982) 1981-1997.
2. BARENDSEN, G.W., BROERSE, J.J.: Experimental radiotherapy of a rat rhabdomyosarcoma with 15 MeV neutrons and 300 kV X-rays. *Europ. J. Cancer* 6 (1970) 89-109.
3. BASERGA, R., MALAMUD, D.: Autoradiography, techniques and application. Harper and Row Publishers, New York - Evanston - London (1969) 3-12, 129-174.
4. BEGG, A.C.: Analysis of growth delay data: potential pitfalls. *Br. J. Cancer* 41, Suppl. IV (1980) 93-97.
5. BEGG, A.C.: Principles and practices of the tumor growth delay assay. In: *Rodent tumour models* (ed. R.F. Kallmann); Pergamon Press, New York - Oxford - Beijing (1987) 114-121.
6. DEACON, J., PECKHAM, M.J., STEEL, G.G.: The radio-responsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother. Oncol.* 2 (1984) 317-323.
7. DENEKAMP, J.: *Cell kinetics and cancer therapy*. Charles C. Thomas Publisher, Springfield (1982).
8. DENEKAMP, J., FOWLER, J.F.: Cell proliferation kinetics and radiation therapy. In: *Cancer. A comprehensive treatise* (ed. E. Becker); Plenum Press, New York - London (1977) 101-137.

9. DENEKAMP, J., STEWART, F.A.: Evidence for repair capacity in mouse tumors relative to skin. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 5 (1979) 2003-2010.
10. DOUGLAS, B.G., FOWLER, J.F.: The effect of multiple small doses of X-rays on skin reactions in the mouse and a basic interpretation. *Rad. Res.* 66 (1976) 401-426.
11. ELKIND, M.M., SUTTON, H.: Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving chinese hamster cells. *Radiat. Res.* 13 (1960) 556-593.
12. FOWLER, J.F.: Review: Total doses in fractionated radiotherapy - implications of new radiobiological data. *Int. J. Radiat. Biol.* 46 (1984) 103-120.
13. HALNAN, K.E.: *Treatment of Cancer*, Chapman and Hall Ltd., London (1982) 333-343.
14. HERMENS, A.F., BARENDSEN, G.W.: Changes of cell proliferation characteristics in a rat rhabdomyosarcoma before and after X-irradiation. *Eur. J. Cancer* 5 (1969), 173-189.
15. HILL, R.P.: The assay of tumor colonies in the lung. In: *Cell clones* (eds. C.S. Potten, J.H. Hendry); Churchill Livingstone, Edinburgh - London - Melbourne - New York (1985) 208-214.
16. HILL, R.P.: The TD_{50} assay for tumor cells. In: *Cell clones* (eds. S. Potten, J.H. Hendry); Churchill Livingstone, Edinburgh - London - Melbourne - New York (1985) 223-230.

17. HILL, R.P.: Measurements of effects on tumors by clonogenicity assays: Excision assays. In: Rodent Tumor Models (ed. R.F. Kallman), Pergamon Press, New York (1987), 67-75.
18. HOLLER, E.: Einfluß einer Tumorbettvorbestrahlung auf Wachstum und Proliferationsverhalten des Harding-Passey-Melanoms der Maus. Diss., Universität München (1981).
19. HUBER, R.: Untersuchungen zum Wachstums- und Proliferationsverhalten des Adenocarcinoms 284 der C3H-Maus nach Tumorbettvorbestrahlung. Diss., Univ. München (1985).
20. JOINER, M.C.: The design and interpretation of "top-up" experiments to investigate the effects of low radiation doses. Int. J. Radiat. Biol. 51 (1987) 115-130.
21. JUNG, H., BECK, H.P., BRAMMER, J., ZYWIETZ, F.: Depopulation and Repopulation of the R1H-rhabdomyosarcoma of the rat after X-irradiation. Europ. J. Cancer 17 (1981) 175-186.
22. KALLMAN, R.F.: The phenomenon of reoxygenation and its implications for fractionated radiotherapy. Radiology 105 (1972) 135-142.
23. KROG, H.: Die Wirkung von Adriamycin auf das Fibrosarkom AT 24 und das Adenokarzinom 284 der Maus. Zusammenhang zwischen Zellinaktivierungsrate und makroskopischer Wachstumsverzögerung. Diss., Univ. München (1986).
24. KUMMERMEHR, J., TROTT, K.-R.: Rate of repopulation in a slow and a fast growing mouse tumor. In: Progress in Radio-Oncology II (eds. K.H. Kärcher, H.D. Kozechuk, G. Reinartz); Raven Press, New York (1982) 299-307.

25. KUMMERMEHR, J., SCHROPP, K., NEUNER, M.: Repopulierung im Plattenepithelkarzinom AT 478 der Maus unter fraktionierter Bestrahlung. "Experimentelle Tumorthherapie", GSF-Bericht, GSF-B-1964 (1986) 31-36.
26. MACIEJEWSKI, B., PREUSS-BAYER, G., TROTT, K.-R.: The influence of the number of fractions and of overall treatment time on local control and late complication rate in squamous cell carcinoma of the larynx. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 9 (1983) 321-328.
27. MALAISE, E.P., CHARBIT, A., CHAVALDRA, N.: Change in volume of irradiated human metastases. Investigation of repair of sublethal damage on tumour repopulation. Br. J. Cancer (1972) 26-43.
28. MALAISE, E.P., FERTIL, B., DESCHAVANNE, P.J., CHAVALDRA, N., BROCK, W.A.: Initial slope of radiation survival curves is characteristic of the origin of primary and established cultures of human tumor cells and fibroblasts. Radiat. Res. 111 (1987) 319-333.
29. MEYER, J.S., BAUER, W.C., RAO, B.R.: Subpopulations of breast carcinoma defined by S-phase fraction, morphology and estrogen receptor content. Lab. Invest. 39 (1978) 225-235.
30. NORIN, T., ONYANGO, J.: Radiotherapy in Burkitt's lymphoma. Conventional or superfractionated regime. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2 (1977) 399-406.
31. PENHALIGON, M., CAMPLEJOHN, R.S.: Improved assay of stromal injury based on the number of tumour cells that can be supported by irradiated flank skin. Br. J. Cancer 53, Suppl. VII (1986) 199-202.

32. PEPPERZEEL, H.A. van: Effects of single doses of radiation on lung metastases in man and experimental animals. *Europ. J. Cancer* 8 (1972), 665-675.
33. PUCK, T.T., MARCUS, P.I.: Action of X-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* 103 (1956) 653-660.
34. RESOULY, A., SVOBODA, V.H.J.: Management of advanced head and neck squamous carcinoma by multiple daily sessions of radiotherapy and surgery. In: *Progress in Radio-Oncology II* (eds. K.H. Kärcher, H.D. Kogelnik, G. Reinartz); Raven Press, New York (1982) 339-347.
35. SANDRITTER, W., THOMAS, C.: *Histopathologie*. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York (1981) 309.
36. SCHUEREN, E. van der, BOGAERT, W. van den, ANG, K.K.: Radiotherapy with multiple fractions per day. In: *The biological bases of radiotherapy* (eds. G.G. Steel, G.E. Adams, M.J. Peckham); Elsevier, Amsterdam - New York - Oxford (1983) 195-210.
37. STEEL, G.G.: Cell loss from experimental tumours. *Cell tissue kinetics* 1 (1968) 193-207.
38. STEEL, G.G.: Growth kinetics of tumours. Cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. Clarendon Press, Oxford (1977).
39. SUI, H.D., HOWES, A.E., HUNTER, N.: Dependence of response of a C3H mammary carcinoma to fractionated irradiation on fraction number and intertreatment interval. *Rad. Res.* 72 (1977) 440-457.
40. THAMES, H.D., HENDRY, J.H.: *Fractionation in Radiotherapy*. Taylor and Francis (1987).

41. THAMES, H.D., PETERS, L.J., WITHERS, H.R., FLETCHER, G.H.: Accelerated fractionation vs hyperfractionation: rationales for several treatments per day. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 9 (1983) 127-138.
42. THOMLINSON, R.H., CRADDOCK, E.A.: The gross response of an experimental tumour to single doses of X-rays. *Br. J. Cancer* 21 (1967) 108-123.
43. TROTT, K.-R., KUMMERMEHR, J.: Split-dose-recovery of a mouse tumour and its stroma during fractionated irradiation. *Br. J. Radiol.* 55 (1982) 841-846.
44. TROTT, K.-R., KUMMERMEHR, J.: What is known about tumour proliferation to choose between accelerated fractionation or hyperfractionation? *Radiother. Oncol.* 3 (1985) 1-9.
45. WANG, C.C., SUIT, H.D., BLITZER, P.H.: Twice-a-day radiation therapy for supraglottic carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 12 (1986) 3-7.
46. WIEDMANN, R.: Die Wirkung von Cyclophosphamid auf das Fibrosarkom SSK 31 der Maus. Diss., Univ. München (1982).
47. WILLIAMS, M.V., DENEKAMP, J., FOWLER, J.F.: A review of α/β ratios for experimental tumors: implications for clinical studies of altered fractionation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 11 (1985) 87-96.
48. WITHERS, H.R., MASON, K.A.: The kinetics of recovery in irradiated colonic mucosa of the mouse. *Cancer* 34 (1974) 896-903.
49. WITHERS, H.R., PETERS, L.J.: Basic principles of radiotherapy. In: *Textbook of Radiotherapy* (ed. G.H. Fletcher); Lea and Febiger, Philadelphia (1980) 105-173.

50. WITHERS, H.R., TAYLOR, J.M.G., MACIEJEWSKI, B.: The hazard of accelerated tumour clonogen repopulation during radiotherapy. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. (1988) in the press.
51. WITHERS, H.R.: The 4 R's of Radiotherapy. In: Advances in Radiation Biology (eds. J.T. Lett, H. Adler); Acad. Press, New York (1975) 241-271.
52. YARNOLD, J.R., BAMBER, J.C., GIBBS, J.: Tumour growth delay as a clinical endpoint for the measurement of radiation response. Radiother. Oncol. 5 (1986) 207-214.

Lebenslauf

Name: Maria-Luise Mayerhausen,
geborene Schrömer

Geburtsdatum: 19.08.1960 in Wallersdorf

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: römisch-katholisch

Eltern: Lothar Schrömer, Landwirt, und Maria
Schrömer, geborene Schraufnagl,
Hausfrau

Schulbildung: 1966-1970 Grundschule Wallersdorf
1970-1979 Gymnasium in Landau an der
Isar
Mai 1979 Abitur

Studium: 1980-1986 Studium der Humanmedizin
an der Ludwig-Maximilians-
Universität München
November 1986 Studienabschluß mit
dem III. Staatsexamen

Berufstätigkeit: seit April 1987 Assistenzärztin in
der Inneren Abteilung des
Kreiskrankenhauses Landau an der Isar

